

UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Caracterização bioquímica e funcional de
complexos proteicos associados ao 3'UTR de
mRNAs alvo**

Mariana Colino de Oliveira

Mestrado em Bioquímica

(área de especialização em Bioquímica Médica)

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Caracterização bioquímica e funcional de complexos
proteicos associados ao 3'UTR de mRNAs alvo**

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Margarida Gama Carvalho

Professor Doutor Carlos Farinha

Mestrado em Bioquímica

(área de especialização em Bioquímica Médica)

"Imagination will often
carry us to worlds that
never were. But without
it we go nowhere."

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à Margarida Gama Carvalho por me ter recebido no seu grupo, onde tive a oportunidade de dar os meus primeiros passos em investigação. Agradeço não só todo o conhecimento transmitido e dedicação na orientação, como também o exemplo que me deu de objectividade, perseverança e ambição em ciência.

Ao Professor Carlos Farinha, um muito obrigada por todo o apoio prestado, dentro e fora do laboratório, por toda a sua simpatia e boa disposição.

Ao Doutor Luís Moita e à Ana Neves-Costa (UBCSI, IMM) agradeço a excelente oportunidade de colaboração, com que pude estender os meus conhecimentos científicos.

Pelos ensinamentos e orientação em toda a parte da espectrometria de massa, gostaria de agradecer aos Profs. Carlos Cordeiro e Gonçalo Costa (FCUL).

Gostaria ainda de agradecer a todos os colegas de laboratório: Ana Luísa, Ana Isabel, Marta, Luísa, Inna, Francisco, Simão e Luka, que proporcionaram sempre um excelente ambiente de convívio. Não posso deixar de fazer um agradecimento particular à Ana Isabel, por toda a ajuda de bancada, pela amizade e partilha de todas as alegrias e frustrações de um ano.

À Ana e à Sara pelos momentos de alheamento do mundo, ao Daniel pelos risos incontrolláveis, ao Armando por me dar outros olhares que não apenas os da ciência, e à Patrícia pela adolescência que ainda passamos juntas, um muito obrigada!

Ao Bruno agradeço por ter estado sempre presente com alegria e carinho, com incansável disponibilidade para discutir ideias e para palavras de ânimo quando as coisas corriam menos bem e sempre com uma amizade inigualável.

Por acreditarem sempre em mim, apoiando-me em tudo, por me ensinarem o mais importante e por me inspirarem todos os dias a ser quem sou, um agradecimento muito especial aos meus pais.

RESUMO

Recentemente, tem sido consolidada a ideia de que os mecanismos pós-transcricionais apresentam um importante papel na regulação da expressão génica, sendo as *RNA-binding proteins* (RBPs) um dos seus principais mediadores. Neste trabalho estudaram-se interações mRNA-proteína em dois contextos diferentes: na resposta imunitária inata e numa doença genética.

No primeiro estudo, em colaboração com a UBCSI do IMM, pretendeu-se averiguar se em resposta à estimulação de células THP-1 com *E. coli* ocorre interacção entre a hnRNP K e os transcritos das proteínas ASF/SF2 e SRp20, cuja actividade inibe a libertação da Interleucina-1 β . Por imunoprecipitação da hnRNP K e qRT-PCR dos transcritos, em consequência da estimulação, observou-se a formação dos referidos complexos RNA-proteína. Adicionalmente, apesar dos resultados inconclusivos para o ASF/SF2, observou-se que a interacção entre a hnRNP K e o transcrito do SRp20 depende da activação da via MAPK/ERK.

A Atrofia Muscular Espinal (SMA) é uma doença autossómica recessiva causada pela perda de função do gene *SMN1*, o qual codifica a proteína SMN. Todos os doentes expressam o *SMN2* que, embora insuficiente para compensar a perda do *SMN1*, também leva à produção de SMN. Dado que quanto maior o número de cópias *SMN2*, menor a severidade da SMA, esta constitui uma forte candidata à aplicação de terapias que aumentem a expressão da SMN por aumento da estabilidade do transcrito *SMN2*. Consequentemente, é necessário identificar os factores envolvidos na modelação da sua estabilidade, nomeadamente RBPs, pelo que se teve como objectivo a identificação de proteínas de ligação ao seu 3'UTR (pois contêm, maioritariamente, as sequências modeladoras da estabilidade dos mRNAs). As proteínas identificadas por espectrometria de massa foram a NUBPL, LARP1, LARP2, LARP4 e hnRNPG, que se prevêem ou já estão caracterizadas como tendo actividade de ligação a nucleótidos e de controlo pós-transcricional, constituindo candidatos interessantes a reguladores da expressão da SMN.

ABSTRACT

RNA-binding proteins (RBPs) are one of the main players in post-transcriptional control. The main goal of this project was to characterize mRNA-RBP interactions in two different contexts: the immune innate response and a genetic disease, the Spinal Muscular Atrophy (SMA).

The UBCSI lab, from IMM, found that ASF/SF2 and SRp20 proteins inhibit IL-1 β secretion, besides evidence of hnRNP K influence on ASF/SF2 and SRp20 expression. Jointly with the UBCSI lab, we hypothesized that hnRNP K interaction with ASF/SF2 and SRp20 transcripts on THP-1 cells occurred in response to *E. coli* stimulation, and further assessed the possible role of hnRNP K as a post-transcriptional regulator of these mRNA-targets. As a result of *E. coli* stimulation, mRNP complexes between hnRNP K and both transcripts were detected (using qRT-PCR after immunoprecipitation). Although an interaction with SRp20 was observed to be dependent on MAPK/ERK pathway activation, data for ASF/SF2 was inconclusive.

SMA is an autosomal recessive neuromuscular disease caused by the loss of function of the *SMN1* gene, which codes for the SMN protein. All patients express *SMN2*, which also codes for SMN, although at insufficient levels to compensate for *SMN1* loss. The disease severity is inversely proportional to *SMN2* copy number, which makes SMA a strong candidate for the application of therapeutic approaches leading to increased mRNA stability, and thus of higher SMN levels. We proposed to identify the factors involved in *SMN2* transcript stabilization, namely RBPs. Since 3'UTRs are transcript regions involved on mRNA stability control, we looked for RBPs that bound to the 3'UTR of *SMN2*. Using mass spectrometry we identified several potential binding proteins: NUBPL, LARP1, LARP2, LARP4 e hnRNP G. These proteins are predicted or have been characterized as having nucleotide-binding activity and a role on post-transcriptional regulation, making them good candidates to bind and modulate *SMN2* transcript stability.

PALAVRAS-CHAVE

- 3'UTR
- ASF/SF2
- estabilidade de mRNAs
- hnRNP K
- RBPs
- SMA
- SRp20

KEYWORDS

- 3'UTR
- ASF/SF2
- hnRNP K
- mRNA stability
- RBPs
- SMA
- SRp20

LISTA DE ABREVIATURAS

% (v/v)	Percentagem expressa em volume/volume
ARE	<i>AU-rich elements</i>
ATP	Trifosfato de Adenosina
Boxes RGG	<i>Boxes Arginina-Glicina-Glicina</i>
cDNA	DNA complementar
dsRBD	<i>double stranded RNA-Binding Domain</i>
domínio PAZ	domínio Piwi/Argonauta/Ziwill
domínio KH	domínio <i>K Homology</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
hnRNP	<i>heterogeneous ribonucleoprotein particle</i>
IL-1 β	Interleucina-1 β
LAM	<i>La Motif</i>
LARP	<i>La-Related Protein</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
miR	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i>
NOVA	<i>Neuro-Oncological Ventral Antigen</i>
NUBPL	<i>Nucleotide-Binding Protein-Like</i>
PABP	<i>Poli-A Binding Protein</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RBP	<i>RNA-Binding Protein</i>
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i>
SMA	Atrofia Muscular Espinal
SMN	<i>Survival of Motor Neuron</i>
SMN Δ 7	SMN mutado no exão 7
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
PALAVRAS-CHAVE	IV
KEYWORDS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Regulação pós-transcricional	3
1.1.1 A molécula de mRNA	3
1.1.2 RNA-binding proteins	4
1.1.3 Estabilidade dos mRNAs	6
1.2 Regulação pós-transcricional na Imunidade Inata	8
1.2.1 Imunidade Inata	8
1.2.2 Diversidade e rapidez nas respostas imunes	10
1.3 Regulação pós-transcricional e doença	11
1.3.1 Atrofia Muscular Espinal	11
Genes <i>SMN1</i> e <i>SMN2</i>	12
Mutações no gene <i>SMN1</i>	13
Número de cópias do <i>SMN2</i> vs. fenótipo da doença	13
Proteína SMN	14
Mecanismos moleculares da SMA	15
Terapia para a SMA	16
2. OBJECTIVOS	17
3. MÉTODOS	18
3.1 Interação da hnRNP K com os transcritos do ASF/SF2 e SRp20 em resposta a estimulação bacteriana	18
3.1.1 Cultura de células	18
3.1.2 Estimulação e UV-crosslinking das células THP-1	18
3.1.3 Extractos citosólicos	19
3.1.4 Imunoprecipitação da proteína hnRNP K	19
3.2 Identificação de potenciais proteínas de ligação ao 3'UTR do <i>SMN2</i>	22
3.2.1 Cultura de células	22
3.2.2 Extractos citosólicos	22
3.2.3 Amplificação e purificação dos fragmentos 3'UTR do <i>SMN2</i>	23

3.2.4	Transcrição <i>in vitro</i> e purificação das sondas biotiniladas	24
3.2.5	Gel de retardação de mRNA	25
3.2.6	<i>Pull-down</i> dos complexos mRNP	26
3.2.7	Análise das amostras de proteína	26
4.	RESULTADOS	30
4.1	Interação da hnRNP K com os transcrito ASF/SF2 e SRp20 em resposta a estimulação bacteriana	30
4.1.1	Pesquisa de motivos de ligação da proteína hnRNP K nos mRNAs alvo	30
4.1.2	Desenho experimental para a averiguação da formação dos mRNPs	31
4.1.3	Avaliação da eficiência de imunoprecipitação da hnRNP K	32
4.1.4	Quantificação de mRNAs associados à hnRNP K	33
4.1.5	Estudo da influência da via MAPK/ERK na interação entre a proteína hnRNP K e os transcrito do ASF/SF2 e SRp20	34
a)	Controlo da associação da hnRNP K aos mRNAs alvo	35
b)	Análise dos níveis totais dos transcritos ASF/SF2 e SRp20 na ausência de inibição	36
c)	Influência da via MAPK/ERK nos níveis totais e de imunoprecipitado do transcrito do SRp20	37
d)	Análise da eficiência de imunoprecipitação do SRp20	39
4.2	Identificação de potenciais proteínas de ligação ao 3'UTR do SMN2	39
4.2.1	Desenho experimental e obtenção de sondas biotiniladas	40
4.2.2	Formação de complexos mRNP com as sondas biotiniladas	42
4.2.3	Análise do padrão de proteína precipitada com as sondas biotiniladas	45
4.2.4	Identificação de proteínas de ligação aos fragmentos do 3'UTR por espectrometria de massa	49
5.	DISCUSSÃO	53
5.1	Interação da hnRNP K com os transcrito ASF/SF2 e SRp20 em resposta a estimulação bacteriana	53
5.2	Identificação de potenciais proteínas de ligação ao 3'UTR do SMN2	56
5.3	Notas finais	60
6.	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Regulação pós-transcricional

Para que a célula cumpra as funções biológicas necessárias para a proliferação e diferenciação é essencial que exista um controlo rigoroso da expressão génica. A perturbação destes mecanismos de regulação pode conduzir a uma situação de doença^{1,2}. Durante décadas pensou-se que o controlo da expressão génica seria feito sobretudo ao nível da transcrição, por modulação da sua activação/repressão^{2,3}. No entanto, recentemente tem sido dada cada vez mais importância à regulação pós-transcricional, a qual tem as vantagens de, por exemplo, poder permitir uma activação da expressão génica muito mais rápida do que a transcrição *de novo*, bem como a possibilidade de um único RNA mensageiro (mRNA) poder originar mais do que um produto proteico³. Os mecanismos pós-transcricionais incluem o processamento, transporte, localização, estabilidade e tradução de mRNAs², sendo as *RNA-binding proteins* (RBPs) os principais mediadores da sua regulação^{1,2,3}.

1.1.1 A molécula de mRNA

Quando, no núcleo, o DNA codificante é transcrito, é originada uma molécula precursora de RNA mensageiro (o pré-mRNA). Em simultâneo com a transcrição, o pré-mRNA vai sendo sujeito a diferentes tipos de processamento de modo a formar a molécula madura. Na extremidade 5' do transcrito é adicionado um *cap*, uma guanina na orientação inversa à dos restantes nucleótidos, que constitui o substrato para várias metilações. Ao longo da cadeia do pré-mRNA, a maquinaria de *splicing* é responsável pela remoção dos intrões e união dos exões. Quando, para a mesma molécula, ocorre inclusão diferencial dos exões na molécula madura, o processo designa-se *splicing* alternativo. Para alguns genes, também pode ocorrer o processo de *editing*, no qual há alteração da sequência do transcrito por inserção ou deleção

específica de uracilos, ou desaminação de citidinas ou adenosinas. Na extremidade a 3', é adicionada uma cauda de poli-adenosinas (poli-A). A selecção do local de formação desta cauda pode ocorrer de forma diferencial, podendo originar transcritos com 3'UTRs de diferentes tamanhos³.

Quando terminada a transcrição e processamento do pré-mRNA, origina-se a molécula madura. Esta pode ser dividida em 3 constituintes principais: uma região codificante central e duas regiões não traduzidas a flanqueá-la, o 5' e o 3'UTR (*untranslated region*)⁴ (**Figura 1**). A região codificante contém a informação necessária para a síntese da proteína, sendo que cada tripleto de ácidos ribonucleicos (codão) codifica para um aminoácido⁴. Os UTRs, apesar de não serem codificantes, são essenciais dado possuírem a maioria da informação genética envolvida no controlo pós-transcricional. Enquanto o transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, localização subcelular e estabilidade do mRNA são modelados maioritariamente pelo 3'UTR, a eficiência de tradução é-o pelo 5'UTR⁴.

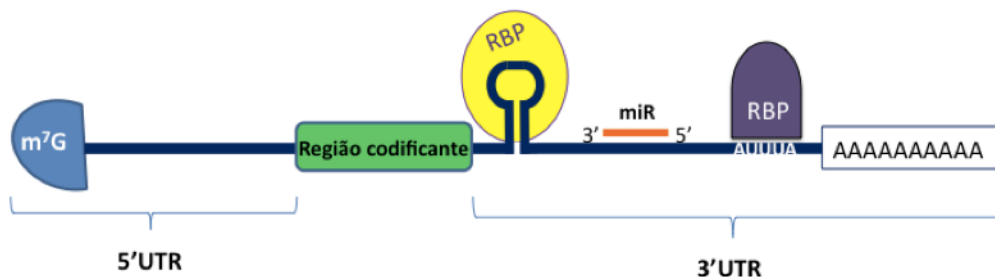


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura de um mRNA maduro. Observa-se a região codificante (a verde) e duas regiões não traduzidas (barra azul), o 5'UTR (que inclui o m⁷G-cap) e o 3'UTR (que inclui a cadeia poli-A). No 3'UTR encontram-se ainda representados elementos que afectam a estabilidade do mRNA, tais como uma sequência representativa de uma estrutura secundária e de um ARE (AUUUA). Estão também representados os factores envolvidos nos mecanismos de regulação pós-transcricional, nomeadamente, duas RBPs e um miR.

1.1.2 RNA-binding proteins

Na célula, o mRNA nunca se encontra “nu” mas sempre revestido por RBPs, constituindo complexos designados mRNP (*messenger ribonucleoprotein*). Estas proteínas desempenham um papel central no controlo dos mecanismos pós-

transcricionais dado que determinam o destino dos mRNAs a que se ligam, seja por alteração do padrão de *splicing*, controlo da localização, aumento ou diminuição da estabilidade ou alteração dos níveis de tradução (**Figura 2**)^{1,3,5}.

As RBPs apresentam uma ou mais repetições de domínios de ligação a mRNA na sua cadeia polipeptídica, sendo estes os que possibilitam a modelação da expressão génica pela ligação aos transcritos de uma forma específica de sequência e/ou de estrutura secundária. O domínio mais comum é o RRM (*RNA Recognition Motif*). No entanto, existem outros, tais como o domínio *K homology* (KH), o domínio Piwi/Argonauta/Zwille (PAZ), o *double stranded RNA-Binding Domain* (dsRBD), *Boxes* RGG (Arginina-Glicina-Glicina) e *zinc fingers*^{3,6}. Adicionalmente aos

motivos de ligação a RNA, as RBPs também se caracterizam pela presença de domínios auxiliares, os quais são responsáveis pela interacção com outras proteínas que contribuem para a regulação positiva ou negativa do transcrito.

As duas famílias de RBPs mais abundantes nas células são as proteínas SR e as *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs)⁷, sendo que partilham grande parte das suas características estruturais e funcionais⁵. As proteínas SR, para além de um ou dois RRMs, têm a particularidade de apresentar um domínio rico em argininas e serinas (domínio RS), o qual possibilita a sua interacção com outras proteínas,

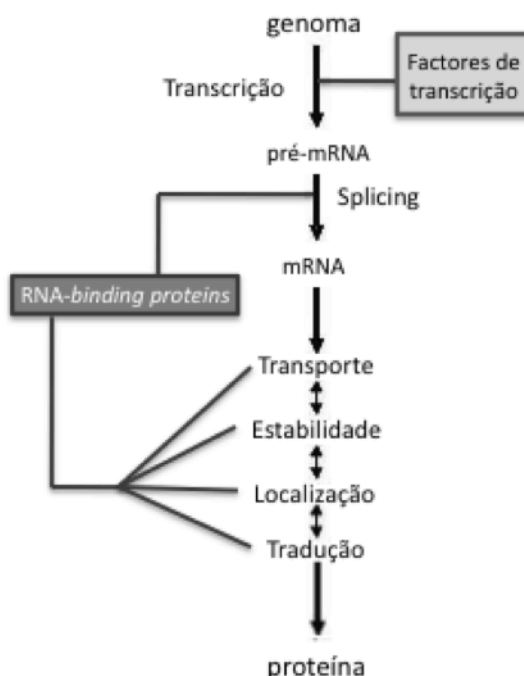


Figura 2 – Representação dos mecanismos de regulação da expressão génica. A transcrição é controlada por factores de transcrição ao nível do promotor e nos mecanismos pós-transcricionais actuam as RBPs, RNA binding proteins. Adaptado de [1].

regulação da actividade por fosforilação e que pode ainda actuar como sinal de localização nuclear^{7,8}. A família das hnRNPs também se caracteriza pela presença de um ou mais motivos de ligação a RNA e de interacção proteica⁹. No entanto, para além de RRM, também se podem encontrar domínios KH e *Boxes* RGG. O domínio KH foi inclusivamente encontrado pela primeira vez num dos membros desta família, a proteína hnRNP K⁹. Tanto as hnRNPs como as proteínas SR estão envolvidas nos processos de *splicing*, transporte, estabilidade e tradução de transcritos^{7,8,9}.

Considerando a importância dos mecanismos pós-transcricionais na regulação da expressão génica, a necessidade da célula de um sistema coordenado de regulação de múltiplos genes e a forma específica de actuação das RBPs, formulou-se a hipótese da existência de “operões pós-transcricionais”. Ou seja, uma RBP, reconhecendo uma sequência específica de mRNA, coordena a expressão de um conjunto de transcritos que contêm essa mesma sequência que, por sua vez, codificam proteínas envolvidas na mesma via ou processo biológico¹. Esta hipótese tem vindo a ganhar consistência com o aparecimento de dados experimentais. Por exemplo, em neurónios de mamíferos, as proteínas *Neuro-oncological Ventral Antigen* (NOVA) regulam o *splicing* de vários pré-mRNAs e, dos pré-mRNAs alvo identificados, Ule *et al.* observaram que grande parte codificava produtos proteicos envolvidos em processos sinápticos inibitórios¹⁰.

1.1.3 Estabilidade dos mRNAs

A regulação da expressão génica através da estabilidade do mRNA é uma das adaptações moleculares mais rápidas na resposta das células a estímulos extrínsecos¹¹ e é o mecanismo de regulação de maior interesse no âmbito desta tese. Como já referido, depende de interacções que ocorrem essencialmente entre sequências específicas no 3'UTR (elementos em *cis*) do próprio transcrito e proteínas que se lhes ligam directamente (elementos em *trans*), as RBPs. Para além das RBPs, outros factores que também podem afectar a estabilidade dos transcritos são os

microRNAs (miRs)², pequenos RNAs que hibridam com sequências complementares de mRNAs alvo, induzindo a sua degradação (**Figura 1**).

As sequências em *cis*, envolvidas na estabilização de um transcrito, mais bem estudadas são os elementos ricos em adenosinas e uridinas (AREs, *AU-rich elements*), sendo constituídas por várias cópias do pentâmero AUUUA ou do nonâmero UUAUUUAUU. Estas sequências, encontradas no 3'UTR, são muito conservadas e podem exercer um efeito tanto positivo como negativo na estabilidade do mRNA, dependendo da RBP com que interagem^{12,13}. Por exemplo, observa-se um efeito estabilizador quando a proteína HuR se liga ao ARE, dado que esta interação promove a ligação de outro domínio da HuR à cauda poli-A, protegendo o transcrito da degradação. No entanto, a ligação da proteína AUF1 ao mesmo elemento promove a degradação do mRNA por desadenilação e recrutamento do exossoma, o complexo responsável pela degradação dos mRNAs, constituído por RBPs e enzimas 3'-5' exoribonucleolíticos^{12,13}. Quando duas proteínas com funções antagónicas competem pelo mesmo local de ligação na sequência de um mRNA, como é o caso da HuR e AUF1, a decisão de estabilização (ou destabilização) desse mRNA específico pela ligação de uma ou outra proteína, é definida pelas concentrações relativas de cada uma¹³. Este balanço de concentrações pode ser influenciado por um estímulo extrínseco afectando, por exemplo, a localização celular das RBPs. Tanto a proteína HuR como a AUF1 localizam-se maioritariamente no núcleo. No entanto, a HuR desloca-se para o citoplasma de uma forma dependente do ciclo celular e a AUF1 é translocada para o citoplasma, por exemplo, em resposta a um choque de temperatura¹³.

A estabilidade de um mRNA é caracterizada pelo seu tempo de semi-vida ($t_{1/2}$), o qual é bastante variável entre transcritos. Alguns mRNAs, como os que codificam proteínas com funções de *housekeeping*¹⁴, têm valores de $t_{1/2}$ que podem chegar a várias horas¹¹ (os da β - e γ -globina foram estimados entre 20 a 29 horas¹⁵). Outros têm tempos de semi-vida curtos (5 a 30 minutos¹¹), permitindo, por exemplo,

alterações rápidas nos níveis de mRNA em resposta a um estímulo. Muitos destes mRNAs possuem os motivos ARE e correspondem, sobretudo, a genes de resposta rápida, como alguns proto-oncogenes, factores de crescimento e respectivos receptores, citocinas e mediadores inflamatórios¹¹.

1.2 Regulação pós-transcricional na Imunidade Inata

Sendo o sistema imune o principal responsável pela defesa do organismo contra qualquer agressão, é essencial, como veremos, que existam formas de criar grande diversidade de produtos proteicos e capacidade de resposta rápida¹⁶. Mais uma vez, para explicar estas características do sistema imune, o principal foco de atenção foi dado à regulação da transcrição. No entanto, cada vez mais se implicam os mecanismos pós-transcricionais na regulação das respostas do sistema imune, nomeadamente, na vertente inata¹⁶.

1.2.1 Imunidade Inata

O sistema imune inato é um dos componentes fundamentais do sistema imunitário que engloba todas as células e mecanismos inespecíficos de combate a infecções.

Um exemplo de mecanismo envolvido em respostas inatas consiste no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), os quais são estruturas essenciais para a sobrevivência dos microorganismos e, por isso, altamente conservadas como, por exemplo, os lipopolissacáridos das membranas externas de bactérias Gram-negativas^{17,18}. Os *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) são receptores expressos em células da imunidade inata, como os macrófagos, e que ao reconhecerem PAMPs, iniciam a resposta efectora por activação da fagocitose, produção de espécies reactivas de oxigénio ou activação de vias de sinalização (por exemplo, do NF- κ B ou

MAPK), que por sua vez promovem a libertação de citocinas^{17,18}. Estas são proteínas-chave na resposta imunitária que estabelecem a comunicação entre células nos processos de combate a patógenos.

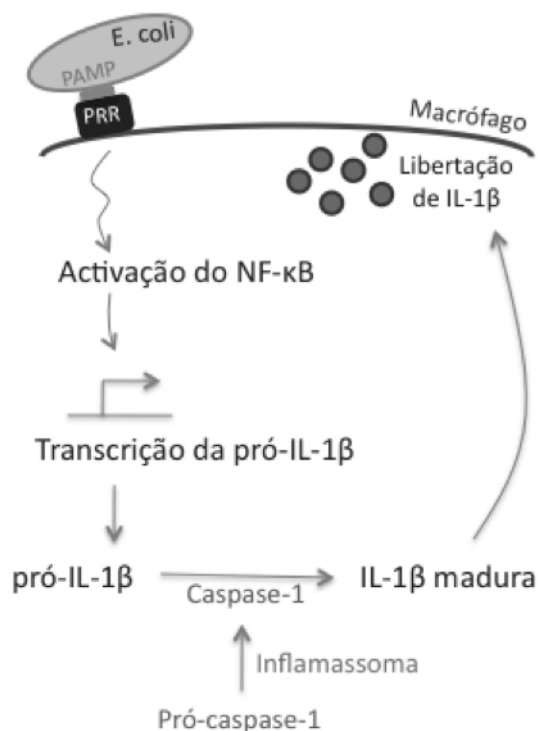


Figure 3 - Representação esquemática da ativação de uma resposta inflamatória do sistema inato. Quando um PAMP é reconhecido por um PRR expresso na membrana de um macrófago, o factor de transcrição NF-κB é activado e inicia a transcrição da pró-IL-1β. Esta é hidrolisada pelo Caspase-1, que por sua vez é activado pelo inflamassoma, originando-se a citocina IL-1β madura.

A IL-1β é um exemplo de citocina pró-inflamatória com um papel fundamental na defesa contra infecções. Entre outras funções, induz a síntese de moléculas lipídicas (como as prostaglandinas) que têm como consequência o aumento da temperatura e vasodilatação, e induz ainda a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, que em conjunto promovem o recrutamento de outras células do sistema imunitário¹⁹.

Para haver síntese da citocina IL-1β (**Figura 3**) é necessário que um PRR, após reconhecer uma estrutura patogénica, active a via

do NF-κB, o qual, sendo um factor de transcrição, activa a transcrição da forma imatura da citocina, a pró-IL-1β (31 kDa)¹⁹. Adicionalmente, um complexo multiproteico designado inflamassoma é activado na presença de dois sinais: um proveniente do reconhecimento de um PAMP por um PRR e outro proveniente do reconhecimento de sinais de perigo (moléculas do hospedeiro que indiciam células em *stress*, infectadas ou a morrer, como o ATP e proteínas cromossomais) pelos

receptivos receptores²⁰. Quando activado, o inflamassoma hidrolisa a pró-Caspase-1 na sua forma activa. Assim, no passo seguinte da síntese da citocina, a forma imatura é clivada pelo Caspase-1 e origina a IL-1 β madura (17 kDa), a qual é finalmente secretada para o meio extracelular^{19,20}.

1.2.2 Diversidade e rapidez nas respostas imunes

Devido à necessidade de diversidade e capacidade de adaptação do sistema imune, um dos mecanismos de regulação a que se tem dado cada vez maior atenção é o *splicing* alternativo¹⁶. Como já referido, o NF- κ B tem um papel preponderante na activação das respostas de defesa imunitária. No entanto, o seu sinal deve ser suprimido de modo a evitar uma sinalização excessiva, caso contrário ocorre lesão dos tecidos. Na repressão deste sinal já foram reportados exemplos de genes que inicialmente activam o NF- κ B mas que, no fim da resposta imune, sofrem *splicing* alternativo e originam outras proteínas que inibem a actividade do factor de transcrição, o que corrobora a importância deste mecanismo²¹.

Outra característica essencial do sistema imune é a capacidade de resposta rápida das células efectoras, sendo a regulação pela estabilidade dos mRNAs um dos mecanismos que mais contribui para esse tipo de respostas. Exemplo disto são os estudos de larga escala de *profiling* de mRNAs ligados a RBPs, nos quais se observou que muitas das proteínas codificadas por esses transcritos estão ligadas a respostas iniciais a estímulos externos e à regulação do metabolismo do RNA²².

Os sinais extrínsecos, como a presença de patógenos, influenciam a estabilidade dos mRNAs pela activação de vias de sinalização aquando do reconhecimento de patógenos, como as vias MAPK (p38, ERK), PI3K-AKT, Wnt/ β -catenina, entre outras²². Estas vias, por sua vez, regulam as RBPs por fosforilação, modificação que pode alterar a sua localização subcelular ou a sua afinidade de ligação para os mRNAs alvo. É o caso do mecanismo que se pensa estar envolvido na regulação do mRNA do *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), uma citocina pró-

inflamatória. Quando é activada a via MAPK p38, ocorre a fosforilação da proteína tristetraprolina (uma RBP destabilizadora com um motivo de ligação a RNA do tipo *zinc finger*), a qual reduz a afinidade de ligação da proteína à região ARE do transcrito do mRNA, deixando de exercer o seu efeito destabilizador²².

1.3 Regulação pós-transcricional e doença

As RBPs, como reguladoras essenciais dos mecanismos pós-transcricionais, têm impacto na expressão génica e, consequentemente, no bom funcionamento do metabolismo das células. Deste modo, mutações em elementos reguladores, tanto na sequência do 3'UTR como nas RBPs, têm sido associadas ao desenvolvimento de patologias (tais como cancro, inflamações crónicas e doenças auto-imunes), reforçando a importância dos mecanismos de regulação pós-transcricional na expressão génica^{4,23}. Percebendo as bases moleculares dos complexos mRNP, nomeadamente as contribuições das estruturas primária e secundária dos mRNAs no reconhecimento por RBPs, e sabendo associar elementos *cis* aos respectivos elementos *trans*, poder-se-á ter uma melhor compreensão sobre o metabolismo dos mRNAs. Com este conhecimento ter-se-á a vantagem de ser fornecida a base para o desenvolvimento de novas terapias através da modulação de mRNPs, nomeadamente em patologias condicionadas por alterações da expressão génica. Uma doença relacionada com a perda de função de uma proteína, SMN (*Survival of Motor Neuron*), envolvida no metabolismo de RNAs e candidata a este tipo de terapias, é a Atrofia Muscular Espinal (*Spinal Muscular Atrophy* ou SMA).

1.3.1 Atrofia Muscular Espinal

A SMA é uma doença autossómica recessiva grave que constitui a segunda causa de morte infantil de base hereditária, apresentando uma incidência de 1 em cada 10000 nascimentos²⁴. A doença caracteriza-se pela perda progressiva de

neurónios motores α da medula espinal, com consequente fraqueza e atrofia dos músculos proximais dos membros e, num estado mais avançado da doença, também do tronco²⁵.

Genes *SMN1* e *SMN2*

Em 1995 foi identificado por Lefebvre *et al.* o gene determinante da SMA, o gene *SMN1* (*Survival of Motor Neuron 1*). Este localiza-se no cromossoma 5q13, tem cerca de 20 kb e é constituído por 8 exões. Origina um transcrito de 1.7 kb, o qual codifica para a proteína SMN e cuja deficiência leva à manifestação da doença^{26,27}.



Figura 4 - Representação esquemática das diferenças ao nível dos genes *SMN1* e *SMN2*, do *splicing* dos seus transcritos e das proteínas que cada um origina. Indivíduos saudáveis expressam o *SMN1* e *SMN2*. No entanto, doentes com SMA, têm perda de função do *SMN1*. A única diferença relevante entre estes genes é uma transição de C para T no exão 7 que favorece, em 90% das situações, a sua exclusão durante o *splicing* do pré-mRNA. Assim, é produzida maioritariamente a proteína SMN Δ 7, truncada e muito instável. Adaptada de [25].

O gene *SMN1* apresenta uma cópia telomérica na mesma região cromossómica, o gene *SMN2*²⁶. Apesar de 5 a 10% da população saudável não ter o *SMN2*, todos os doentes com SMA têm pelo menos uma ou mais cópias deste gene. As sequências dos dois genes diferem em apenas 5 nucleótidos e ambos codificam para a mesma proteína²⁶. No entanto, o gene *SMN2* não é suficiente para compensar a perda do *SMN1* e proteger os indivíduos da SMA. Isto sucede porque uma das diferenças entre os dois genes, uma transição silenciosa de C→T, se localiza numa região reguladora do *splicing*²⁸ contida no exão 7, favorecendo, em cerca de 90% das situações²⁵, a sua

exclusão (**Figura 4**). Assim, devido a este fenómeno de *splicing* alternativo, a partir do gene *SMN2*, é produzida maioritariamente uma proteína truncada, a SMN Δ 7, a qual é rapidamente degradada²⁹.

Mutações no gene *SMN1*

Apesar do gene *SMN2* codificar para a proteína SMN, apenas mutações no *SMN1* conduzem ao fenótipo da SMA, o que é corroborado pela observação de que indivíduos com ausência do *SMN2* em ambos os alelos não apresentam quaisquer sintomas³⁰. 96% dos doentes apresentam mutações no *SMN1* e apenas 4% têm mutações não relacionadas com o cromossoma 5q13. Dentro dos doentes com mutações no *SMN1*, a mais comum (96,4%) é a deleção homozigótica dos exões 7 e 8 ou apenas do 7. Na restante população (3,6%), o gene sofre deleção num dos alelos e, no outro alelo, pode apresentar diferentes mutações³⁰. Destas encontram-se descritas as seguintes: *missense*, *nonsense*, *frameshift*, deleções, inversões e mutações em locais de *splicing*. De todas estas, a mutação *missense* Y272C é a mais frequente, com uma incidência de cerca de 33,3%³¹.

Número de cópias do *SMN2* vs. fenótipo da doença

A SMA, de acordo com a severidade, é classificada de I a IV, sendo o tipo I o mais, e o IV o menos severo. A severidade da doença está inversamente relacionada com o número de cópias do gene *SMN2*, que varia dentro da população. Assim, doentes com SMA tipo I apresentam 1 a 2 cópias deste gene e geralmente morrem antes dos 2 anos de idade por insuficiência e/ou infecção respiratória^{32,33}. Doentes com SMA tipo II têm 3 cópias do *SMN2* e têm apenas a capacidade para se sentar e com SMA tipo III têm 3 a 4 cópias e conseguem sentar-se e andar^{25,33}. A SMA tipo IV é relativamente pouco comum, no entanto já foi observado que os doentes têm 4 ou mais cópias do *SMN2* e apenas apresentam alguma fraqueza muscular a partir dos 30 anos³⁴. Para além disto, ratinhos *Smn*^{-/-} (que, naturalmente não têm o gene *SMN2*)

com um número variável de cópias do *SMN2* humano confirmaram o efeito deste gene no fenótipo da doença. Com 1 ou 2 cópias do *SMN2* os ratinhos morrem depois de uma perda significativa de neurónios motores, mas com 8 não há manifestação deste fenótipo³⁵.

Proteína SMN

A proteína SMN, codificada pelos genes *SMN1* e *SMN2*, é uma proteína expressa constitutivamente com 294 aminoácidos e um peso molecular de 38 kDa. Existe na forma de um complexo, o complexo SMN, constituído por uma proteína SMN e sete Gemins (Gemin2 a Gemin8). O complexo existe no citoplasma mas encontra-se enriquecido em estruturas discretas no núcleo, designadas *Gems*. O complexo SMN participa na biogénese das *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs), as quais são constituídas por um snRNA e um núcleo de proteínas Sm. Neste processo, o complexo SMN tem a função de reconhecer e de se ligar aos componentes das snRNPs, favorecendo a interacção entre eles de modo a que se forme o complexo snRNA-proteína. Esta função é essencial dado que as snRNPs constituem o spliceossoma, o qual promove o *splicing* dos pré-mRNAs^{27,36} (**Figura 5**).

Para além da sua função no metabolismo de mRNAs, a proteína SMN poderá ter um papel no transporte axonal. Em neurónios motores de ratinho foi observado que a SMN liga à hnRNP R que por sua vez se liga ao 3'UTR do mRNA da β -actina, transportando-o para os cones de crescimento dos neurónios motores, onde a proteína forma o citosqueleto necessário para o crescimento axonal³⁷.

A proteína SMN Δ 7 é o principal produto do *SMN2* e resulta do *skipping* do exão 7. Embora o seu transcrito seja abundante na célula, a proteína existe em níveis muito baixos, o que se deve à sua maior instabilidade ($t_{1/2}$ = 3 horas, enquanto o da SMN é superior a 8 horas³⁸). Uma das razões apontadas é a ineficiência de oligomerização da proteína³⁹. No entanto, foi recentemente demonstrado que a SMN Δ 7 é também intrinsecamente instável, dado que com o fenómeno de *splicing*

alternativo é exposta no C-terminal uma sequência de quatro resíduos de aminoácidos que constitui um forte sinal para a degradação (*degron*)³⁸.

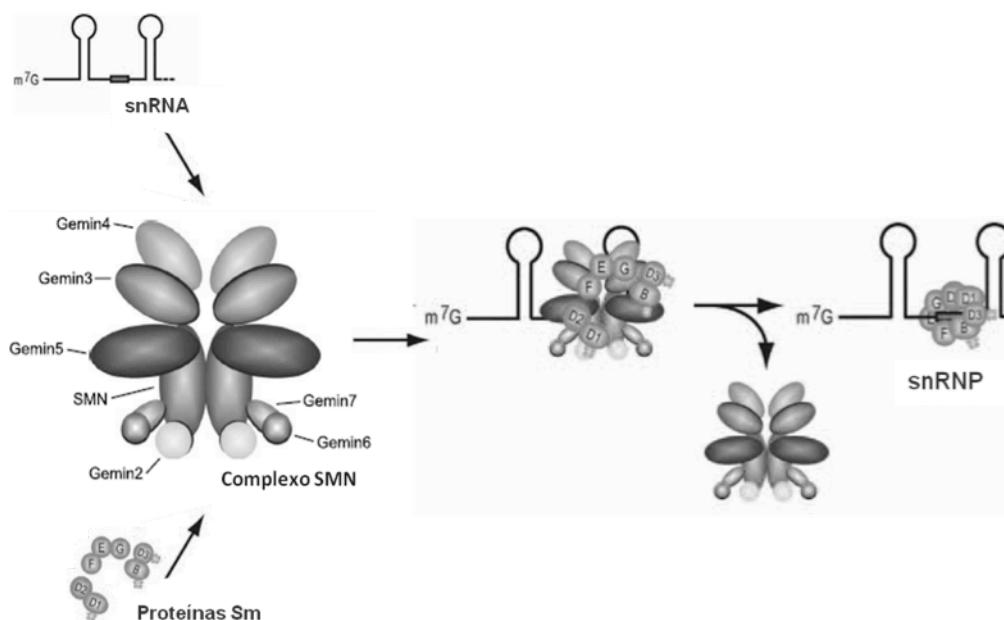


Figura 5 – Representação esquemática do complexo SMN e da sua função na biogénese de snRNPs. O complexo SMN é constituído por uma proteína SMN e 7 proteínas Gemin. Este complexo promove a interacção entre um snRNA e proteínas Sm, levando à formação das snRNPs, que por sua vez são constituintes fundamentais do spliceossoma. Adaptado de [27] e [36].

Mecanismos moleculares da SMA

O mecanismo responsável pela degeneração específica dos neurónios motores ainda não está bem esclarecido. Por um lado pode-se justificar por uma elevada demanda de associação eficiente de snRNPs e processamento de RNA nos neurónios motores. Por outro, a associação ineficiente das snRNPs pode causar o *splicing* incorrecto de um ou mais mRNAs essenciais para a sobrevivência destas células²⁷. Outra hipótese é a existência de funções específicas da SMN nos neurónios motores, como o transporte axonal de mRNAs, essenciais para a sobrevivência e função da célula³⁷.

Terapia para a SMA

Dada a correlação da severidade da doença com os níveis de proteína SMN, as terapias para a SMA baseiam-se na tentativa de os aumentar, de que são exemplos: **1)** a activação da transcrição por estimulação do promotor do gene *SMN2* (utilizando inibidores de histonas desacetilases ou compostos que regulam a metilação do promotor), **2)** a correcção do *splicing* do pré-mRNA do *SMN2* (utilizando, por exemplo, pequenas moléculas *antisense*), **3)** a activação da tradução e estabilização da proteína SMN (com fosfatases ou cinases) e **4)** a compensação da falta de proteína SMN (com terapia génica ou células estaminais). Outra forma que tem sido utilizada consiste na tentativa de melhoramento da viabilidade dos neurónios motores através da utilização de factores neurotróficos e compostos neuroprotectores e com exercício físico regular²⁵.

Como vimos, a estabilidade do mRNA constitui um ponto de regulação muito importante na expressão génica dado que, em geral, determina também a eficiência de tradução. Assim, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que modulem a estabilidade de mRNAs poderá vir a ser bastante útil. Por exemplo, é possível bloquear o acesso a RBPs destabilizadoras a elementos de sequência dos transcritos com *morpholinos*. Estes são pequenos oligonucleótidos sintéticos que hibridam com a respectiva sequência alvo com grande afinidade, são estáveis e a sua entrega, *in vivo*, em animais adultos já foi conseguida^{40,41,42}. Pouco estudos têm incidido sobre os mecanismos de estabilidade do transcrito do *SMN2*, pelo que identificando RBPs com um efeito destabilizador aquando da ligação ao seu 3'UTR pode permitir o desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica que aumente especificamente a expressão da proteína SMN em doentes com SMA.

2. OBJECTIVOS

Têm sido reportadas cada vez mais evidências para a importância dos mecanismos pós-transcricionais na regulação da expressão génica, os quais são fundamentalmente mediados pela interacção específica entre mRNAs e RNA-*binding proteins*. Neste projecto pretendeu-se estudar a forma como as RBPs participam na regulação da expressão génica, utilizando metodologias para a caracterização de complexos RNA-proteína aplicadas em dois estudos:

(1) um, centrado numa proteína reguladora, a hnRNP K, em que se averiguaram interacções que a proteína poderia estabelecer com determinados mRNAs (nomeadamente, os que codificam as proteínas ASF/SF2 e SRp20), em resposta à infecção por *E. coli* de uma linha celular de monócitos. Este estudo inseriu-se no contexto de uma colaboração com a Unidade de Biologia Celular do Sistema Imune (UBCSI) do Instituto de Medicina Molecular (IMM);

(2) outro, centrado num mRNA de interesse, o do *SMN2*, em que se teve como objectivo a identificação de proteínas reguladoras. O maior conhecimento sobre a regulação da estabilidade deste transcrito contribuirá, a longo termo, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para os doentes com SMA, baseadas no aumento da produção de proteína SMN funcional.

3. MÉTODOS

3.1 Interacção da hnRNP K com os transcritos do ASF/SF2 e SRp20 em resposta a estimulação bacteriana

3.1.1 Cultura de células

As células THP-1 (ATCC TIB-202) foram cultivadas em meio R10-RPMI (GIBCO) suplementado com 10% (v/v) Soro Bovino Fetal (GIBCO), 1% (v/v) Penicilina-Streptomicina (GIBCO), 1% (v/v) Piruvato (GIBCO), 1% (v/v) L-Glutamina (GIBCO), 1% (v/v) Aminoácidos não-essenciais (GIBCO), 1% (v/v) Tampão Hepes (GIBCO) e 0.05 M 2-Mercaptoetanol (GIBCO), à temperatura de 37°C e com uma atmosfera com 5% de dióxido de carbono. A cultura destas células foi realizada pela Unidade da Biologia Celular do Sistema Imune (UBCSI), do Instituto de Medicina Molecular (IMM).

3.1.2 Estimulação e UV-crosslinking das células THP-1

As células THP-1 foram incubadas com *E. coli* fixadas em metanol (20 bactérias por macrófago) a 37°C numa atmosfera com 5% de dióxido de carbono durante 0 ou 15 minutos, ou 4 horas. No ensaio de inibição da via MAPK/ERK, previamente à estimulação com bactérias incubaram-se as células com o inibidor PD98059 (Cell Signaling Technology) durante 1 hora, também a 37°C numa atmosfera com 5% de dióxido de carbono. A estimulação das células com bactérias e a inibição da via MAPK/ERK também estiveram a cargo da UBCSI, IMM.

Após estimulação, centrifugaram-se as células durante 5 minutos a 1500 rpm à temperatura ambiente. Recolheu-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 10 mL de PBS frio. Em seguida, numa placa de Petri, irradiaram-se as células com luz ultravioleta (400 mJ/cm²). As células foram sedimentadas como anteriormente e

removeu-se o sobrenadante, deixando apenas cerca de 1 mL. As células foram novamente ressuspensas, transferidas para um microtubo e sedimentadas. Após remoção de todo o sobrenadante, congelou-se o *pellet* celular de células em azoto líquido e armazenou-se a -80°C. Todos os materiais e reagentes necessários neste procedimento foram gentilmente cedidos pelo Dr. Luís Moita, da UBCSI.

3.1.3 Extractos citosólicos

Os sedimentos de células foram descongelados no gelo e ressuspensos em 1 mL de PXL (1x PBS, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.5% NP-40) com inibidores de proteases (Mini-Complete protease inhibitors, EDTA-free, Roche) e incubou-se em gelo durante 10 minutos. Adicionaram-se 400 U de RNasina (Promega) e 100 U de DNase I, RNase *free* (Fermentas) e incubou-se durante 15 minutos a 37°C, ou até a solução deixar de estar viscosa. Centrifugou-se à velocidade máxima numa centrífuga de microtubos durante 10 minutos a 4°C e recolheu-se o sobrenadante (extracto citosólico). Foram reservados 100 µL de extracto para a extracção e análise de RNA total e 10 µL para a análise de proteína.

3.1.4 Imunoprecipitação da proteína hnRNP K

a) Preparação das *beads*: em cada imunoprecipitação, por cada 5 milhões de células utilizaram-se 50 µL de *beads* de Sepharose ligadas a Proteína A (GE Healthcare). Lavaram-se as *beads* 3 vezes com 1 mL de PXL durante 5 minutos em rotação à temperatura ambiente, seguindo-se o seu bloqueio com BSA RNase-*free* não acetilada (Ambion), tRNA (Ambion) e anticorpos. Nas imunoprecipitações específicas utilizou-se um anticorpo anti-hnRNP K (Santa Cruz Biotechnology) e para as de controlo usou-se IgG de rato (Santa Cruz Biotechnology). A cada 200 µL de *beads* (volume seco) foram adicionados 5 mg de BSA, 1 mg/mL tRNA, 16 µg anti-hnRNP K ou 66 µg IgG e perfiz-se o volume de 800 µL com PXL. Procedeu-se a uma

incubação de 45 minutos à temperatura ambiente, com rotação, seguida de 3 lavagens, como descrito anteriormente.

b) Imunoprecipitação: incubou-se em rotação durante 1 hora a 4°C, 50 µL de *beads* com anticorpo (volume seco), 100 µL de extracto, 200 µL de PXL e 40 U RNasina (Promega). Procedeu-se à sedimentação das *beads* numa microcentrífuga à velocidade máxima, tendo-se reservado 20 µL para a análise de proteína e 200 µL para a de RNA. Após remoção completa do sobrenadante, lavaram-se as *beads* 3 vezes em 500 µL de PXL, durante 5 minutos em rotação à temperatura ambiente. Os complexos foram eluídos com 210 µL de TES (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% SDS), dos quais 10 µL foram usados na análise de proteína e 200 µL para a extracção de RNA.

c) Western blot: a cada amostra de extracto para análise de proteína foi adicionada RNase A (Sigma) a uma concentração final de 200 µg/µL e incubou-se 30 minutos em gelo. Em seguida, foi adicionado tampão de amostra 2x (80 mM Tris pH 6.8, 16% glicerol, 4.5% SDS, 150 mM DTT, 0.01% azul bromofenol) e aqueceu-se 5 minutos a 98°C. As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE num mini-gel 8% Acrilamida/Bis-Acrilamida e, subsequentemente, transferidas para uma membrana de PVDF (BioRad) durante 1 hora a 100 V. Após a transferência realizou-se o bloqueio da membrana com 5% de leite magro em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. Nas mesmas condições incubou-se, em seguida, a membrana com o anticorpo primário anti-hnRNP K (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:10000 em 2.5% de leite magro em PBS e procedeu-se a 3 lavagens de 5 minutos com PBS-0.1% Tween 20 (Sigma Aldrich). O anticorpo secundário usado foi anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de rábano (Sigma Aldrich), diluído 1:4000 em 2.5% de leite magro em PBS, com o qual se incubou a membrana durante 30 minutos. A revelação do sinal da proteína hnRNP K foi realizada utilizando os Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare).

d) Extracção de RNA e RT-qPCR: adicionaram-se 100 µL de TES às amostras do extracto total e 20 µL de proteinase K a todas as amostras para extracção de RNA ($C_f = 2 \text{ mg/mL}$), tendo-se incubado em seguida durante 20 minutos a 37°C. Extraíu-se o RNA seguindo o protocolo do *Tri Reagent Solution* (Ambion) e, no final, ressuspendeu-se o extracto em 50 µL de água RNase free. De seguida, foi feita a quantificação das amostras de RNA por leituras de absorvência a 260 e 280 nm no NanoDrop Spectrophotometer ND-100 (NanoDrop Technologies) (uma unidade de absorvência corresponde a 40 ng/µL) e avaliou-se o grau de pureza com a razão 260/280 obtida (considerando-se um elevado grau de pureza quando a razão tem o valor de 2.0).

Com o objectivo de sintetizar a cadeia complementar de DNA dos mRNAs (cDNA) foi feita a reacção de transcrição reversa. Antes desta reacção removeu-se o DNA genómico da preparação de RNA, incubando-a durante 30 minutos a 37°C com 1 U de DNase I, RNase free (Fermentas) e o respectivo tampão. Em cada preparação de RNA imunoprecipitado foi utilizado o volume máximo de RNA (8 µL) e, nas amostras de RNA total, cuja concentração excedia os 125 ng/µL, utilizou-se 1 µg de RNA (para não exceder a quantidade recomendada). Para terminar a reacção adicionou-se 1 µL de 25 mM EDTA e incubou-se durante 10 minutos a 65°C. Segundo as instruções do fabricante, procedeu-se, em seguida, à reacção de transcrição reversa com o RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) e no qual se utilizaram *random hexamer primers*.

Após validação das amostras por PCR convencional, os transcritos do ASF/SF2, SRp20 e G6PD foram quantificados por PCR quantitativo (**Tabela 1**) com triplicados técnicos. A quantificação foi realizada utilizando o método da SyBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), tendo-se seguido as indicações do produto e aparelho, CFX Real Time System c1000 Thermal Cycler (BioRad), o qual foi gentilmente cedido pela Dra. Manuela Coelho, do Centro de Biologia Animal da FCUL. Em cada reacção

aplicaram-se 2 µL de cDNA diluído 1:5 da reacção de RT. A abundância relativa de cada alvo nas amostras foi determinada a partir de uma curva de calibração com 5 diluições sucessivas de 1:5 de uma preparação de cDNA genómico. Em todas as reacções realizou-se ainda a análise da curva de *melting* de modo a confirmar a existência de apenas um produto de amplificação.

Tabela 1 - *Primers forward (Fwd) e reverse (Rev) usados na qRT-PCR dos transcritos que codificam para os genes do ASF/SF2, SRp20 e G6PD.*

	Primer Fwd	Primer Rev
ASF/SF2	CCGCATCTACGTGGGTAAC	GTCCTCGAACTCAACGAAGG
SRp20	GGGGTCGTCGCCCTCGAGAT	AAGGGACCTGCTCCGGCTGC
G6PD	GAACGTGAAGCTCCCTGACG	TCAATCTGGTGCAGCAGTGG

3.2 Identificação de potenciais proteínas de ligação ao 3'UTR do *SMN2*

3.2.1 Cultura de células

As células Be(2) (ou SK-N-SH, ATCC HTB-11) foram cultivadas em meio de cultura constituído por 40% (v/v) de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, GIBCO), 40% (v/v) de *F-12 Nutrient Media* (GIBCO) e 10% (v/v) Soro Bovino Fetal (GIBCO). As células HEK-293 (ATCC CRL-1573) foram crescidas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, GIBCO), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (GIBCO). Ambas as células foram mantidas a 37°C numa atmosfera com 5% de dióxido de carbono.

3.2.2 Extractos citosólicos

As células Be(2) ou HEK-293 foram ressuspensas em Tampão de Lise (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.3% NP-40 e inibidores de proteases - Mini-Complete protease inhibitors, EDTA-free, Roche), de modo a obter uma

concentração final de 4.25×10^7 células/mL. Em seguida foram incubadas durante 5 minutos no gelo e centrifugadas durante 10 minutos, à velocidade máxima a 4°C e recolheu-se o sobrenadante, correspondente à fracção citosólica.

A concentração proteica dos extractos foi determinada pelo método de Lowry modificado. Num volume final de 400 µL prepararam-se soluções de BSA com diferentes concentrações, bem como uma diluição de 1:40 do extracto citosólico. Em seguida, a cada solução, adicionaram-se 400 µL de Solução A (0.1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg/L tartarato de potássio, 10 mg/mL Na_2CO_3 , 2.5% SDS, 0.2 M NaOH), agitou-se no vórtex e incubou-se durante 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se ainda 200 µL de Reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:5 em água, agitou-se no vórtex e fez-se nova incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos. Por último, realizaram-se leituras de absorvência a 750 nm. Aos pontos de absorvência vs. concentração de BSA ajustou-se uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a qual, por interpolação, permitiu a determinação da concentração do extracto proteico.

3.2.3 Amplificação e purificação dos fragmentos 3'UTR do *SMN2*

Três segmentos de cerca de 200 bp do 3'UTR do gene *SMN2* (designados A, B e C) foram amplificados por PCR. Na amplificação de cada segmento, a montante de cada *primer Forward* (**Tabela 2**) estava contida a sequência promotora reconhecida pelo T7 RNA polimerase, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG, gerando os segmentos A1, B1 e C1. Para servirem de controlo negativo, amplificaram-se ainda os mesmos segmentos da sequência do 3'UTR, utilizando os mesmos pares de *primers* mas com a sequência promotora ligada ao *primer Reverse* (**Tabela 2**) (segmentos A2, B2 e C2).

Tabela 2 – *Primers* usados na amplificação dos fragmentos do 3’UTR do *SMN2* que serviram de *template* na transcrição *in vitro* das sondas biotiniladas. A sequência reconhecido pelo T7 RNA Polimerase encontra-se indicada a negrito.

Segmentos específicos	
<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
A1 TAATACGACTCACTATAGGGGGAGAAATGCTGGCATAGAG	TTTCACATTGCATTGTTATT
B1 TAATACGACTCACTATAGGGTGTAATAACCAAATGCAATGTGA	AACTACAACACCCTTCTCACAGC
C1 TAATACGACTCACTATAGGGTTTATTGGTAATTTTATGAGCTGTGA	TCGGACCAAATACAATCACAGATACAGCT
Segmentos controlo negativo	
<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
A2 GGAGAAATGCTGGCATAGAG	TAATACGACTCACTATAGGGTTTCACATTGCATTGTTATT
B2 TGTAAATAACCAAATGCAATGTGA	TAATACGACTCACTATAGGGA ACTACAACACCCTTCTCACAGC
C2 TTTATTGGTAATTTTATGAGCTGTGA	TAATACGACTCACTATAGGG ACAATCACAGATACAGCT

As reacções de PCR (de 35 ciclos de amplificação) foram realizadas num volume final de 50 µL, contendo cada uma 500 ng de DNA (vector contendo a sequência do 3’UTR do *SMN2*). Todo o volume destas reacções foi aplicado num gel de agarose 1.5%. Após corrida das amostras, a visualização das bandas foi realizada com 70% de radiação ultravioleta (de modo a evitar mutações), tendo estas sido cortadas e colocadas num tubo de 1.5 mL. Em seguida, realizou-se a purificação do DNA de acordo com o protocolo de extracção em gel do *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), sendo que a eluição do DNA foi realizada com 50 µL de água RNase *free*. A quantificação do DNA foi feita através de leituras de absorvência a 260 nm no NanoDrop (uma unidade de absorvência corresponde a 50 ng/µL) e o seu grau de pureza avaliado pela razão das absorvências a 260 e 280 nm (considera-se elevado para razões com o valor de 1.8).

3.2.4 Transcrição *in vitro* e purificação das sondas biotiniladas

Nos ensaios de transcrição foi utilizado o enzima T7 RNA polimerase (Fermentas), juntando-se em cada reacção 100 µg do template de DNA (segmento do 3’UTR amplificado anteriormente por PCR), 1x transcription buffer (Fermentas), 1

mM ATP, UTP e GTP, 0.8 mM CTP, 0.2 mM Biotina-14-CTP (Invitrogen), 50 U RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas) e 30 U do polimerase. O procedimento da incubação e paragem da reacção foi seguido de acordo com as especificações do enzima.

O *total RNA purification protocol* do *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) é adequado para a purificação de transcritos com tamanho superior a 200 bp. Dado que os fragmentos de RNA obtidos têm um tamanho inferior (cerca de 190 bp) a esse limite mínimo, o protocolo foi adaptado segundo recomendações disponíveis no *site* da QIAGEN. Assim, antes da passagem da amostra na coluna de purificação, foram adicionados, a cada uma, 350 µL de tampão RTL e 1225 µL de etanol 100%, agitando-se em seguida por inversão. Subsequentemente, o protocolo adoptado foi o fornecido pelo produto, tendo sido aplicados 50 µL de água RNase-free na coluna para a eluição do RNA. Tal como anteriormente, foram feitas leituras de absorvência a 260 nm e 280 nm para a determinação da concentração e pureza de cada amostra.

3.2.5 Gel de retardação de mRNA

a) Complexos mRNPs: incubaram-se 125 ng de sonda durante 5 minutos a 65°C e deixou-se repousar 5 minutos em gelo. Subsequentemente, incubaram-se as sondas com 25 µg de extracto citosólico e 20 U de RNasina (Promega) (perfazendo um volume final de 10 µL com Tampão de Incubação: 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂), durante 30 minutos e agitando ocasionalmente. A cada amostra adicionaram-se 2.2 µL de RNA *loading buffer* (50% (v/v) etanol, 10% (v/v) azul de bromofenol, 40% (v/v) TBE 10x).

b) Blotting: as amostras foram resolvidas num gel não desnaturante (6% Acrilamida/Bis-Acrilamida, TBE 1x, 0.1% PSA, 0.08% TEMED, sendo o volume perfeito com água RNase-free), durante 1 hora em gelo. Antes da corrida das amostras, deixou-se polimerizar o gel durante 1 hora e fez-se uma pré-corrida de 30 minutos a 20 mA (para eliminar resíduos de PSA, distribuir iões e assegurar uma voltagem e

temperatura do gel constantes). Realizou-se a transferência durante 1 hora a 950 mA em gelo, para uma membrana de PVDF (BioRad), a qual foi seguidamente irradiada com luz Ultravioleta (120 mJ/cm^2). Depois de bloquear a membrana durante 1 hora com 7% BSA (Sigma-Aldrich) em TBS (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl), incubou-se durante 30 minutos com Avidina-Peroxidase de Rábano (BioRad) diluído 1:400000 em 5% BSA em TBS. A revelação das bandas foi feita utilizando o Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore).

3.2.6 *Pull-down* dos complexos mRNP

a) Preparação das *beads*: lavaram-se as *beads* de Streptavidina-Agarose (Invitrogen) três vezes com 1 mL de Tampão de Incubação, durante 5 minutos em rotação. Em seguida, foram bloqueadas com tRNA de levedura (Ambion) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Cada 100 μL de solução de *beads* (contendo um volume seco de cerca de 50 μL) foram bloqueados com 100 μg de tRNA (Ambion) e 40 μL de Tampão de Incubação.

b) Complexos mRNP: incubaram-se 100 μg de extracto citosólico com 500 ng de sonda de RNA biotinilado e 40 U RNasina (Promega) (perfazendo o volume final de 200 μL com Tampão de Incubação), durante 1 hora a 4°C.

c) *Pull-down* dos complexos: incubaram-se os complexos mRNP com 20 μL de *beads*, em rotação, durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, procedeu-se a duas lavagens de 5 minutos, em rotação, à temperatura ambiente, com 1 mL de Tampão de Incubação e a uma última lavagem de 10 minutos com Tampão Final (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.3% NP-40). Depois das lavagens secaram-se muito bem as *beads* e eluíram-se os complexos com 30 μL de 2x tampão de amostra.

3.2.7 Análise das amostras de proteína

a) Separação em gel: a separação das proteínas foi efectuada num mini-gel de 10%

Acrilamida/Bis-Acrilamida, tendo sido aplicado em cada poço o volume total de cada amostra, 30 μ L.

b) Coloração com nitrato de prata: fixaram-se as proteínas no gel incubando-o durante 1 hora com 40% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético glacial. Seguidamente incubou-se o gel durante 30 minutos com 30% (v/v) etanol, 0.2% (v/v) tiossulfato de sódio, 68 mg/mL de acetato de sódio e lavou-se 3 vezes durante 5 minutos com água Mili-Q. Procedeu-se à reacção com prata, na qual o gel foi incubado numa solução de 2.5 mg/mL de nitrato de prata. Lavou-se o mesmo com água Mili-Q duas vezes durante 1 minuto e revelaram-se as bandas com a solução de revelação (25 mg/mL de carbonato de sódio e 0.03% (v/v) formaldeído). O gel deve-se permanecer nesta solução o tempo suficiente para que surjam as bandas, evitando no entanto excesso de ruído. Para parar a reacção substituiu-se a solução de revelação por uma de 14.6 mg/mL de EDTA. O volume de todas as reacções foi perfeito com água Mili-Q e as incubações sempre à temperatura ambiente e com agitação. Alternativamente a este protocolo, para a coloração dos géis com prata, também foi utilizado o *Plus One Silver Staining Kit Protein* (GE Healthcare), cedido pelo Prof. Dr. Carlos Cordeiro.

c) Espectrometria de massa: As bandas identificadas como específicas foram excisadas do gel de Acrilamida/Bis-Acrilamida e foram lavadas duas vezes com 200 μ L de água Mili-Q durante 20 minutos à temperatura ambiente e com agitação. Removeu-se todo o líquido e adicionaram-se 30 μ L de 100% acetonitrilo (ACN) incubando-se, em agitação, a 37°C durante 30 minutos. De modo a reduzir as proteínas, eliminando pontes de per-sulfureto existentes nas proteínas, substituiu-se a solução de 100% ACN por 20 μ L de 10 mM DTT em 100 mM NH_4HCO_3 (hidrogénio carbonato de amónio) e incubou-se com agitação durante 45 minutos a 56°C. Em seguida, arrefeceu-se a amostra à temperatura ambiente e removeu-se o excesso de líquido. Para evitar a reformação das pontes de per-sulfureto, procedeu-se à alquilação dos resíduos de cisteína por adição de 20 μ L de 55 mM iodoacetamida em 100 mM NH_4HCO_3 , incubando-se, em seguida, no escuro durante 30 minutos.

Lavaram-se ainda 3 vezes as bandas de proteína com 20 µL de 100% ACN durante 5 minutos à temperatura ambiente com agitação. Por fim, procedeu-se à sua secagem completa utilizando uma centrífuga de vácuo. Para a digestão enzimática das proteínas em gel, rehidrataram-se as partículas de gel com 20 µL de tampão de digestão, contendo 50 mM NH_4HCO_3 e 6.7 ng/µL de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega), durante 30 minutos a 4°C. Adicionou-se líquido suficiente para cobrir os pedaços de gel e 15 minutos depois, no caso de o volume inicial ter sido absorvido, adicionou-se mais líquido. Ao fim dos 30 minutos removeu-se o excesso de líquido não absorvido, adicionaram-se 20 µL de 50 mM NH_4HCO_3 e incubou-se *overnight* a 37°C. Depois desta incubação, recolheu-se o líquido, correspondente à proteína digerida, para um novo tubo e armazenou-se a -20°C.

Antes da aplicação das amostras de proteína na placa para serem identificadas por espectrometria de massa, procedeu-se à sua concentração e purificação. Assim, prepararam-se microcolunas de purificação em pontas finas (GeLoader tip, Eppendorf). Em primeiro lugar, pressionou-se a extremidade da ponta fina e, com uma seringa, fizeram-se passar 20 µL de 50% ACN, verificando que o fluxo era restringido. Utilizando a seringa, aplicou-se a resina na ponta fina preparada anteriormente, confirmando que ficava na sua extremidade e bem compactada. A coluna foi equilibrada com 20 µL de 0.1% TFA e as amostras de proteína digeridas foram passadas pela coluna. Em seguida, procedeu-se à lavagem das colunas com 20 µL de 0.1% TFA e os péptidos foram eluídos com cerca de 5 µL de matriz (ácido α ciano-4-hidroxicinâmico, CHCA, Sigma Aldrich) directamente para a placa de MALDI. Toda a preparação das amostras para espectrometria de massa foi realizada com os reagentes cedidos pelo Prof. Dr. Carlos Cordeiro.

As amostras foram analisadas por MALDI-TOF e a identificação das proteínas foi feita utilizando a ferramenta MASCOT *Peptide Mass Fingerprint*

(<http://www.matrixscience.com/>). Os parâmetros usados foram: (1) Base de dados: SwissProt, (2) Enzima: Tripsina, (3) Clivagens falhadas permitidas: 1, (4) Grupo taxonómico: *Homo sapiens*, (5) Modificações fixas: carboamidometilação, (6) Modificação variável: oxidação de metioninas e (7) Tolerância da massa do péptido: 1 ppm. A identificação foi feita usando as probabilidades baseadas no *score* MOWSE, igual a $-10 \times \log(P)$, onde P é a probabilidade do *match* observado ser um evento aleatório. Os *scores* de proteína superiores a 53 são considerados estatisticamente significantes ($P < 0.05$) de acordo com as variáveis seleccionadas. O processo de obtenção de espectros e análise de dados foi inteiramente realizada pelo Prof. Dr. Gonçalo Costa.

4. RESULTADOS

4.1 Interação da hnRNP K com os transcrito ASF/SF2 e SRp20 em resposta a estimulação bacteriana

Com o objectivo de identificar factores moduladores da secreção de interleucina-1 β , a Unidade de Biologia Celular do Sistema Imunitário do Instituto de Medicina Molecular realizou um *screen* de shRNAs contra factores de *splicing*, cinases e fosfatases em células THP-1 (linha celular de monócitos humanos) estimuladas com bactérias *E. coli*. Neste trabalho, os factores de *splicing* ASF/SF2 e SRp20 (da família das proteínas SR) foram identificados consistentemente como reguladores negativos da secreção de IL-1 β : quando os genes destes factores foram silenciados por RNAi, observou-se um aumento da secreção de IL-1 β , sendo que a sua sobre-expressão fez com que a secreção da citocina diminuísse⁴³. Dados preliminares obtidos na mesma altura sugeriram que a resposta à estimulação com *E. coli* se correlaciona com um decréscimo dos níveis destas proteínas. Por outro lado, observou-se que o silenciamento da proteína hnRNP K tem como consequência a diminuição da produção de IL-1 β (Alves, P.M., *et al.*, dados não publicados). O estabelecimento de interações entre a proteína hnRNP K e o 3'UTR de mRNAs em resposta à activação da via MAPK/ERK, resultando na inibição da sua tradução, já foi anteriormente descrito⁴⁴. Colocou-se assim a hipótese de que, em resposta à estimulação bacteriana, possa ocorrer a ligação da proteína hnRNP K aos transcritos do ASF/SF2 e SRp20, resultando na regulação negativa da expressão de ambos, o que se pretendeu testar no presente trabalho.

4.1.1 Pesquisa de motivos de ligação da proteína hnRNP K nos mRNAs alvo

A proteína hnRNP K apresenta actividade de ligação a DNA e RNA através dos seus três domínios *K homology* (KH)⁴⁵, os quais reconhecem de forma específica um

único *cluster* rico em citosinas, poli-(C)⁴⁶. A interacção da proteína hnRNP K com transcritos através destes domínios tem sugerido não só o seu envolvimento na estabilização de mRNAs (*e.g.*, do mRNA da Renina através da ligação ao 3'UTR⁴⁷) como também na tradução, seja pela sua activação⁴⁸ ou inibição⁴⁴.

De modo a sustentar a hipótese de que em resposta à estimulação bacteriana ocorre interacção entre a proteína hnRNP K e os transcritos do ASF/SF2 e SRp20 utilizou-se a ferramenta *Splicing Rainbow* (<http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi?method=8>) para a pesquisa de motivos de ligação da proteína hnRNP K nos transcritos do ASF/SF2 e SRp20. Em ambos identificou-se a existência de locais potenciais de ligação da proteína (**Tabela 3**), o que apoia a hipótese formulada.

Tabela 3 – Esquematização dos resultados obtidos na previsão bioinformática, utilizando a ferramenta *Splicing Rainbow*, do número de locais de ligação da proteína hnRNP K ao 3'UTR dos transcritos do ASF/SF2 e SRp20 e, considerando a diferença de tamanhos dos 3'UTRs dos dois transcritos, de uma medida do número de locais de ligação em função do tamanho do 3'UTR (nº locais por 100 nt).

RNA-binding protein	transcrito					
	Asf/Sf2			SRp20		
hnRNP K	tamanho (nt)	nº seq	nº/100 nt	tamanho (nt)	nº seq	nº/100 nt
	4483	65	1.4	1443	15	1.0

4.1.2 Desenho experimental para a averiguação da formação dos mRNPs

Com o objectivo de averiguar a interacção entre proteína e transcritos do ASF/SF2 e SRp20 em resposta a um estímulo bacteriano, realizou-se a imunoprecipitação (IP) da hnRNP K e quantificaram-se os transcritos co-imunoprecipitados em células THP-1, na presença e ausência de bactérias. Assim, procedeu-se primeiramente à estimulação das células THP-1 com *E. coli* durante 0 minutos, 15 minutos ou 4 horas. De modo a promover o *crosslinking* entre mRNAs e RBPs, irradiaram-se as células com luz ultravioleta (UV). A partir dos extractos destas células e utilizando anticorpos anti-hnRNP K, realizou-se a IP da proteína hnRNP K e quantificaram-se os mRNAs, na fracção de imunoprecipitado, por qRT-PCR (**Figura 6**).

Como controlo negativo de IP realizou-se um ensaio análogo, no qual em vez da utilização de um anticorpo anti-hnRNP K, utilizou-se uma IgG inespecífica. Adicionalmente à quantificação dos transcritos do ASF/SF2 e Srp20, também se procedeu à do G6PD, o qual serviu de controlo negativo uma vez que é expresso constitutivamente e cujo transcrito não se encontra descrito como interactuando com a hnRNP K.

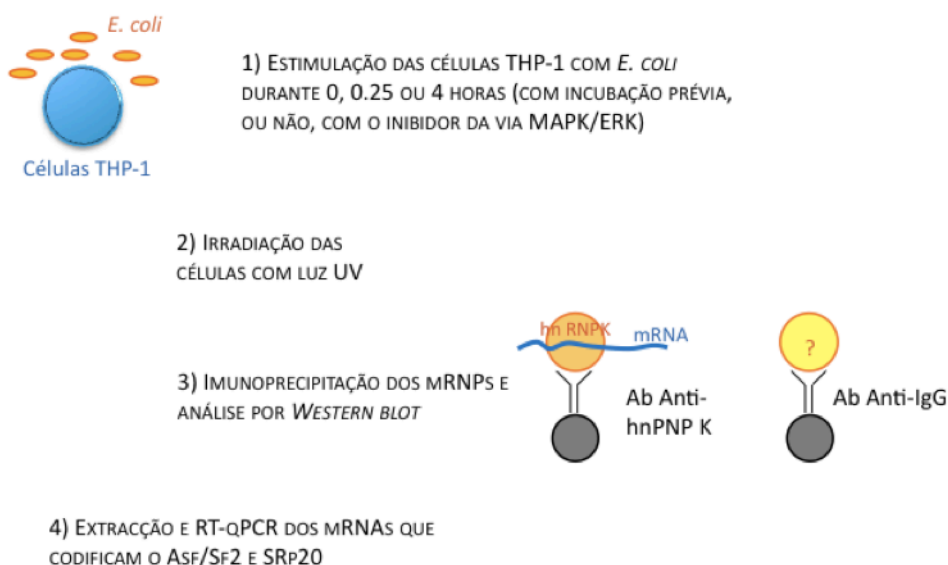


Figura 6 - Esquema geral do procedimento para a averiguação da interacção entre a proteína hnRNP K e os transcritos dos factores ASF/SF2 e Srp20. Após contacto com bactérias *E. coli* durante 0, 0.25 ou 4 horas, as células THP-1 foram irradiadas com luz UV. A partir de cada extracto proteico, realizou-se a IP da hnRNP K utilizando anticorpos contra a proteína e, como controlo negativo, utilizou-se uma IgG inespecífica. Com o objectivo de confirmar a IP, realizou-se uma análise por *Western blot* da hnRNP K e, de modo a avaliar se ocorre interacção entre a mesma proteína e os transcritos que codificam o ASF/SF2 e Srp20, estes últimos foram quantificados por qRT-PCR nas amostras de imunoprecipitado.

4.1.3 Avaliação da eficiência de imunoprecipitação da hnRNP K

Tendo em vista a avaliação da eficiência da IP analisaram-se os níveis de proteína hnRNP K por *Western blot* nas fracções de proteína no extracto total, no imunoprecipitado e no sobrenadante. Por observação dos resultados obtidos apresentados na **Figura 7**, representativos das três IPs realizadas nas células THP-1,

mostra-se que a qualquer tempo de estimulação com bactérias, a hnRNP K encontra-se maioritariamente na fracção do imunoprecipitado e não na do sobrenadante, indicando boa eficiência do ensaio de IP. Adicionalmente, observa-se que a IP da hnRNP K ocorre especificamente, dado que no ensaio utilizando um controlo de isotipo (IgG) a proteína não foi imunoprecipitada, estando apenas presente no sobrenadante (**Figura 7**).

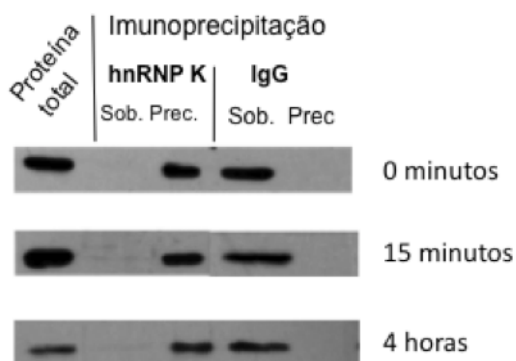


Figura 7 - IP da proteína hnRNP K de extractos citosólicos de células THP-1 estimuladas 0, 0.25 e 4 horas com *E. coli*, utilizando um anticorpo anti-hnRNP K ou uma IgG, como controlo negativo. *Western blot* da hnRNP K no extracto total, no imunoprecipitado e no sobrenadante.

4.1.4 Quantificação de mRNAs associados à hnRNP K

De modo a averiguar se ocorre interacção entre a hnRNP K e os mRNAs dos factores ASF/SF2 e SRp20, como já referido, os níveis destes transcritos co-imunoprecipitados com a proteína foram quantificados por qRT-PCR. A normalização foi feita por divisão das quantidades de cada transcrito (ASF/SF2 e SRp20) às do G6PD. Adicionalmente, para cada tratamento, foram determinadas as razões da quantidade de transcrito imunoprecipitado com [a hnRNP K/a IgG inespecífica]. Novamente pela determinação de rácios, normalizou-se cada ensaio ao de t_0 (sem estimulação), permitindo a observação para cada amostra, de um enriquecimento relativo.

Em comparação com o tempo zero, t_0 , observa-se um enriquecimento acentuado da quantidade de mRNA do ASF/SF2 imunoprecipitado, tanto aos 15 minutos como às 4 horas de estimulação das células THP-1 com *E. coli* (**Figura 8**). Embora não tão acentuado como o do ASF/SF2 também se observa um enriquecimento do transcrito do SRp20 aos 15 minutos. Às 4 horas, observa-se, um

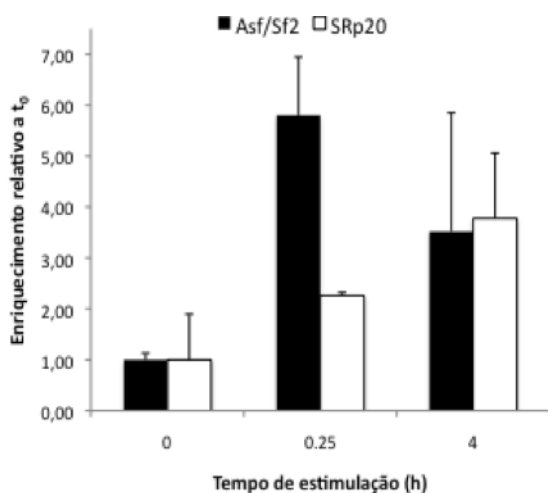


Figura 8 – IP da hnRNP K citosólica de células THP-1 estimuladas 0, 0.25 e 4 horas com *E. coli*. Quantificação por qRT-PCR dos transcritos do ASF/SF2 (preto) e SRp20 (branco) normalizados ao gene constitutivo G6PD, à precipitação controle com IgG, e ao tempo 0, t_0 , correspondente ao ensaio sem estimulação. n=3.

enriquecimento semelhante para os dois transcritos, sugerindo uma cinética de regulação diferente, que poderá estar relacionada com o maior número de motivos de ligação da hnRNP K ao 3'UTR dos transcritos do ASF/SF2 (**Tabela 3**). Os resultados sugerem então que, em resposta a estimulação bacteriana ocorre interacção entre a proteína hnRNP K e os transcritos do ASF/SF2 e SRp20.

4.1.5 Estudo da influência da via MAPK/ERK na interacção entre a proteína hnRNP K e os transcrito do ASF/SF2 e SRp20

Resultados entretanto obtidos pelo grupo da UBCSI sugeriram que os níveis totais dos transcritos do ASF/SF2 (Alves, P. *et. al*, dados não publicados) e do SRp20⁴³ diminuem em resposta a estimulação com *E. coli*. Consistentemente com dados da literatura que mostram que a activação da via MAPK/ERK promove a acumulação citoplasmática da hnRNP K, modelando a expressão de transcritos alvo⁴⁴, foi ainda observado que o silenciamento da hnRNP K conduzia a uma diminuição menos acentuada da expressão do ASF/SF2 (Alves, P.M., *et al.*, dados não publicados) e que a diminuição da sua expressão era dependente da via MAPK/ERK (Alves, P.M. *et al.*, dados não publicados).

Tendo em consideração estes últimos resultados da UBCSI, pretendeu-se testar o efeito da via MAPK/ERK sobre a interacção observada entre a hnRNP K e os mRNAs do ASF/SF2 e SRp20. Para fins comparativos, procedeu-se à análise de amostras submetidas e não submetidas à estimulação com *E. coli* (0 e 0.25 horas), na presença

e ausência de inibição da via MAPK/ERK (I e NI). Todo o procedimento de tratamento das células THP-1 e de imunoprecipitação foi análogo ao anterior, com exceção de que nas amostras em que se inibiu a via MAPK/ERK, previamente à estimulação das THP-1 com *E. coli*, as células foram incubadas com o inibidor PD98059 (Cell Signaling Technology). Tal como anteriormente (**Figura 7**) a eficiência da IP da hnRNP K em cada amostra foi previamente confirmada por *Western blot*. De referir que como se fez apenas um ensaio, os resultados obtidos são preliminares e, para uma maior confiança nas conclusões tiradas, será necessário um maior número de replicados.

a) Controlo da associação da hnRNP K aos mRNAs alvo

De forma a confirmar os resultados obtidos anteriormente (**Figura 8**) neste novo ensaio, analisaram-se os níveis de cada transcrito imunoprecipitado na ausência de inibidor da via MAPK/ERK. Tal como anteriormente, após quantificação dos transcritos por qRT-PCR, os valores de mRNA imunoprecipitado com a hnRNP K foram normalizados aos de imunoprecipitado com IgG inespecífica, aos do G6PD e ao respectivo ensaio sem estimulação bacteriana.

Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 9**. A partir destes observou-se que, contrariamente ao observado anteriormente (**Figura 8**), em resposta a 15 minutos de estimulação com *E. coli*, ocorre uma diminuição da interacção do transcrito do ASF/SF2 com a hnRNP K (**Figura 9**).

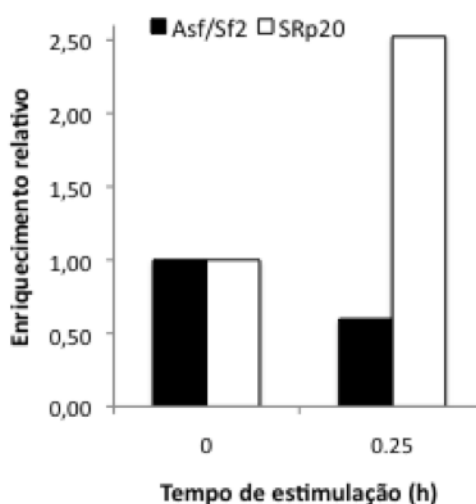


Figura 9 - Quantificação por qRT-PCR dos transcritos do ASF/SF2 (a preto) e SRp20 (a branco) imunoprecipitados com a hnRNP K e normalizados aos valores de quantificação dos respectivos transcritos precipitados com uma IgG inespecífica, ao G6PD e ao respectivo ensaio sem estimulação, t_0 .

Apesar da discordância dos resultados para o transcrito do ASF/SF2, os do SRp20 foram consistentes, isto porque na ausência de inibidor, com a estimulação bacteriana, observou-se um enriquecimento do transcrito imunoprecipitado (**Figura 9**) e, inclusivamente, na mesma ordem de grandeza que o observado no primeiro ensaio (**Figura 8**), de cerca de 2.5 vezes.

Neste ensaio, apesar da corroboração da formação de complexos mRNP da proteína hnRNP K com o transcrito do SRp20, o mesmo não sucedeu com o do ASF/SF2. Esta inconsistência e flutuações nos resultados do transcrito do ASF/SF2 foi igualmente observada de forma recorrente pela UBCSI. Procedeu-se seguidamente à avaliação da variação dos níveis totais de cada transcrito, de modo a comparar com os resultados obtidos previamente pela UBCSI e confirmar se os pressupostos que levaram ao desenvolvimento da nossa hipótese se verificavam.

b) Análise dos níveis totais dos transcritos ASF/SF2 e SRp20 na ausência de inibição

As inconsistências nos resultados de interacção do mRNA do ASF/SF2 com a hnRNP K (**Figuras 8 e 9**) levaram-nos a questionar a concordância deste ensaio com os dados preliminares da UBCSI. Consequentemente, teve-se como objectivo a quantificação dos níveis totais de cada transcrito (do ASF/SF2 e SRp20), de modo a verificar se as variações entre amostras ocorriam de acordo com o previamente observado e, portanto, se estavam de acordo com os pressupostos inicialmente apresentados. Assim, procedeu-se à qRT-PCR a partir dos extractos celulares (mRNA total, isto é, antes da IP), com e sem estimulação com *E. coli*, na ausência de inibidor, tendo os dados sido normalizados aos obtidos para o mRNA do gene do G6PD.

Observando os resultados obtidos na **Figura 10**, verifica-se que em resposta a estimulação bacteriana, na ausência de inibição da via MAPK/ERK, ocorreu um aumento inesperado dos níveis totais do transcrito do ASF/SF2, enquanto que o mRNA do SRp20 apresentou o comportamento esperado de diminuição. Esta discrepância em relação às observações anteriores efectuadas por nós e pela UBCSI

permite explicar o motivo pelo qual não conseguimos reproduzir os resultados que demonstraram a associação da proteína hnRNP K ao mRNA do ASF/SF2.

Estas grandes flutuações no comportamento do ASF/SF2 em células THP-1 estimuladas com *E. coli* foram também observadas pelo grupo da UBCSI, pelo que foi tomada a opção de não prosseguir com o estudo deste transcrito. Desta forma, procedeu-se à caracterização do impacto da activação

da via MAPK/ERK na associação entre a hnRNP K e o mRNA do SRp20, que apresentou um comportamento extremamente reprodutível ao longo de todos os ensaios efectuados.

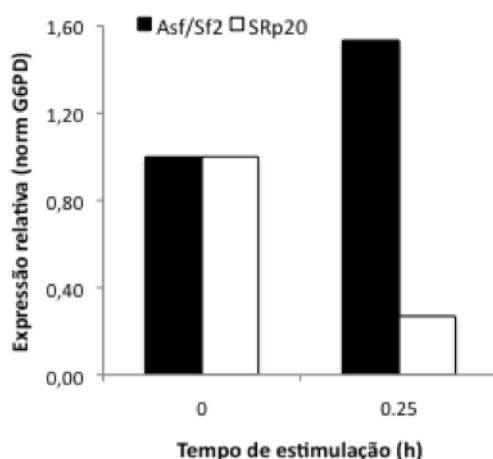


Figura 10 - Quantificação por qRT-PCR do mRNA total dos transcritos do ASF/SF2 (a preto) e do SRp20 (a branco). A normalização dos dados foi feita relativamente aos dados de quantificação do G6PD e do ensaio sem estimulação, t_0 .

c) Influência da via MAPK/ERK nos níveis totais e de imunoprecipitado do transcrito do SRp20

Com o objectivo de analisar as variações dos níveis totais de cada transcrito em consequência da inibição da via MAPK/ERK, procedeu-se, tal como anteriormente, à quantificação por qRT-PCR do transcrito que codifica o SRp20 nos extractos totais de células submetidas aos diferentes tratamentos. Como já observado, na ausência de inibição ocorre uma diminuição acentuada dos níveis do transcrito total aquando da estimulação bacteriana (**Figura 10 e 11A**), sendo esta concordante com os dados previamente obtidos pela UBCSI. No entanto, na presença de inibidor da via MAPK/ERK, os níveis totais de mRNA do SRp20 são muito semelhantes tanto na presença como na ausência de estimulação com *E. coli* (**Figura 11A**), pelo que o inibidor terá impedido essa diminuição acentuada e, portanto, sugere-se que a via

MAPK/ERK terá influência sobre a variação dos níveis totais deste transcrito aquando da estimulação. De notar ainda que a presença de inibidor por si só os diminuiu (0h na ausência vs. presença de inibidor) (**Figura 11A**), o que poderá ser explicado por algum efeito inespecífico do inibidor.

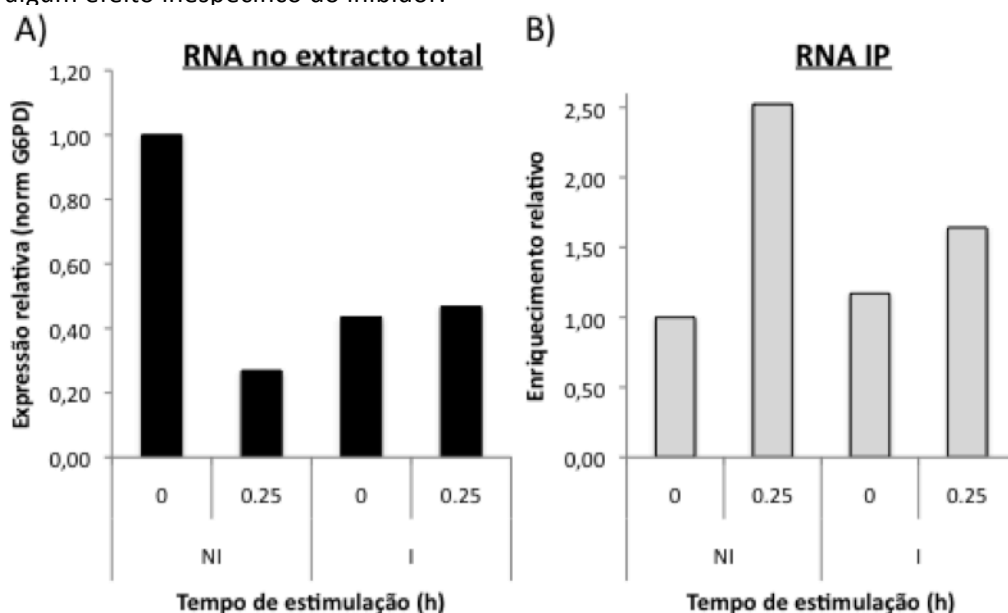


Figura 11 – Ensaio de inibição da via MAPK/ERK em células THP-1, no qual se analisaram lisados de células estimuladas com *E. coli* durante 0 ou 15 minutos, na presença (I) e ausência (NI) de inibidor. Quantificação por qRT-PCR dos níveis de mRNA do SRp20 **A)** no extracto total (normalizado ao G6PD) e **B)** imunoprecipitado com a hnRNP K (normalizado à IP utilizando IgG inespecífica e ao G6PD).

Relativamente ao mRNA do SRp20 imunoprecipitado com a hnRNP K, na ausência de inibidor da via MAPK/ERK, verificou-se o aumento do número de complexos mRNP entre a hnRNP K e o transcrito referido (**Figura 9 e 11B**). Ao inibir a via de sinalização, não se observou contudo esse enriquecimento acentuado, pelo que a activação da via também terá influência sobre esta interacção RNA-proteína.

Em conjunto, estes resultados mostram que a estimulação bacteriana promove a interacção da hnRNP K com o transcrito SRp20, bem como uma diminuição acentuada dos seus níveis totais, sugerindo ainda que estes efeitos são dependentes da via MAPK/ERK, dado que não se verificam na presença de um seu inibidor.

d) Análise da eficiência de imunoprecipitação do SRp20

Tendo em consideração a observação de que em resposta a diferentes tratamentos às células THP-1 ocorrem grandes alterações nos níveis totais de mRNA do SRp20, torna-se importante a verificação de que essas variações não alteram a análise dos resultados nem influenciam as conclusões sobre a existência de interação. Assim, recorreu-se a uma abordagem alternativa, em que normalizando os dados de mRNA imunoprecipitado aos níveis totais do mesmo transcrito, se obteve uma medida rigorosa da eficiência da IP em cada amostra e, portanto, da

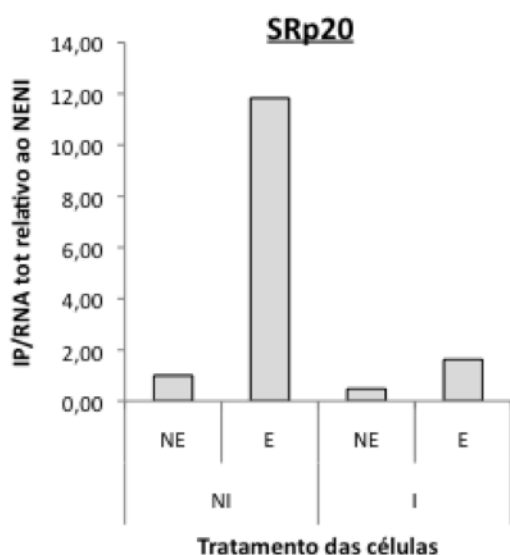


Figura 12 - Ensaio de inibição da via MAPK/ERK em células THP-1, no qual se analisaram lisados de células com 0 (NE) e 15 minutos (E) de estimulação com *E.coli* e na presença (I) e ausência (NI) de inibidor. Quantificação por qRT-PCR do mRNA do SRp20 imunoprecipitado normalizado à quantidade total do mesmo mRNA e ao ensaio NE.NI.

formação de mRNPs com a hnRNP K. Os resultados encontram-se apresentados na **Figura 12**.

Com esta abordagem, demonstrou-se não só a grande eficiência de IP do transcrito do SRp20 aquando do estímulo bacteriano, como a sua abolição aquando da inibição da via MAPK/ERK (**Figura 12**). Novamente, estes resultados sugerem a existência de interação da hnRNP K com o transcrito do SRp20, em resposta a um estímulo bacteriano, bem como a sua dependência na activação da via MAPK/ERK.

4.2 Identificação de potenciais proteínas de ligação ao 3'UTR do *SMN2*

Com o objectivo de identificar potenciais RBPs modeladoras da estabilidade do mRNA do *SMN2*, pretendeu-se identificar que proteínas interagem de modo

específico com o seu 3'UTR. O estudo foi feito nesta região do transcrito, dado que são sequências destas regiões que determinam em grande parte a sua estabilidade⁴.

4.2.1 Desenho experimental e obtenção de sondas biotiniladas

De modo a obter uma identificação de proteínas reguladoras mais específica de região, o 3'UTR foi amplificado por PCR em 3 segmentos (A, B e C) (**Figura 13**). Dado que cada um destes produtos de amplificação viria a servir de molde na transcrição *in vitro*, os *primers Forward* para cada segmento foram desenhados de modo a terem a montante da sua sequência, a sequência reconhecida pelo enzima T7 RNA polimerase. Estes segmentos com a sequência T7 a montante do 3'UTR (no qual foi utilizado o *primer Forward* com o referido promotor) constituem o molde para a transcrição do segmento específico do 3'UTR do *SMN2* e foram designados A1, B1 e C1 (**Figura 13**). De modo a gerar um controlo negativo para cada segmento, a PCR de cada um foi feita da mesma forma que anteriormente, exceptuando que nesta amplificação o *primer* contendo a sequência promotora do T7 RNA polimerase foi o *primer Reverse*. Desta forma, aquando da transcrição foram originados transcritos com uma sequência complementar e invertida à do RNA do UTR, sondas A2, B2 e C2 (**Figura 13**).

Na transcrição *in vitro* dos segmentos do 3'UTR do referido gene com o T7 RNA Polimerase foi incorporada biotina-14-CTP (CTP biotinilada com um espaçador entre ambos de 14 carbonos). Para efeitos de verificação da eficiência de transcrição e incorporação da biotina, realizou-se um ensaio de transcrição das sondas C com e sem CTP biotinilada e correram-se as amostras num gel de agarose (**Figura 14**). Dos resultados obtidos, observa-se um sinal intenso correspondente à banda de RNA (cerca de 200 bp) confirmando a eficiência da transcrição. Adicionalmente, nas amostras correspondentes às reacções com CTP biotinilada observa-se um ligeiro retardamento na migração, relativamente às das reacções sem biotinilação, que se deverá à presença de biotina na sonda. Assim, as observações confirmaram que as

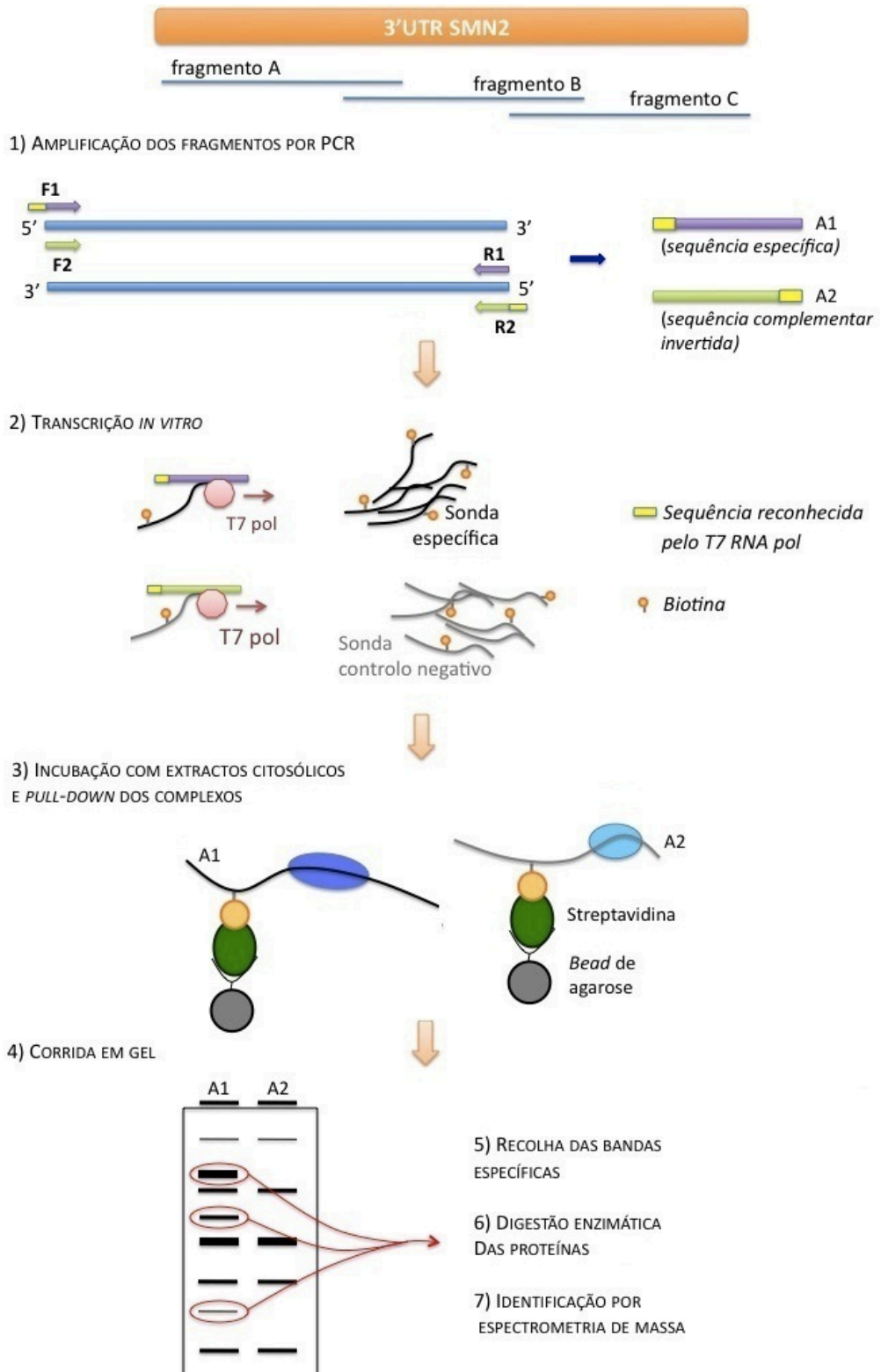


Figura 13 (página anterior) – Esquematisação do procedimento geral para a identificação de potenciais proteínas de ligação ao segmento A do 3'UTR do *SMN2*. O 3'UTR foi amplificado em 3 segmentos utilizando um par de *primers* com a sequência promotora do T7 RNA Polimerase a montante do Forward (F, a roxo) ou a montante do Reverso (R, a verde). As sequências amplificadas, aquando da transcrição *in vitro*, originam, respectivamente, a sequência de mRNA do 3'UTR (A1, a preto), específica, ou a sequência complementar invertida, que servirá de controlo negativo (A2, a cinzento). As sondas obtidas foram, em seguida, incubadas com extractos de células Be(2) ou HEK-293 e o *pull-down* realizado por precipitação após incubação com *beads* ligadas a Streptavidina. As amostras de proteína precipitada foram corridas em gel de Acrilamida/Bis-Acrilamida e, para visualização das bandas, o gel foi corado com nitrato de prata. Finalmente, as bandas específicas seleccionadas foram recolhidas do gel e digeridas enzimaticamente para identificação por *Peptide Mass Fingerprinting*.

condições de transcrição *in vitro* escolhidas levam não só a uma transcrição eficiente como à incorporação de biotina nas sondas.

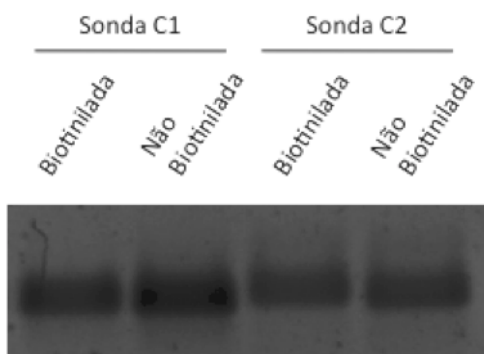


Figura 14 – Gel de agarose das amostras de RNA obtidas por transcrição *in vitro* da sonda C1 e C2 na presença e ausência de CTP biotinilada.

4.2.2 Formação de complexos mRNP com as sondas biotiniladas

Tendo a confirmação da transcrição eficiente das sondas biotiniladas, pretendeu-se, em seguida, averiguar se nas condições experimentais utilizadas, ocorria a formação de complexos mRNP. Para tal, realizou-se um gel de retardação, no qual, pela detecção do RNA, se tem como objectivo observar diferenças de migração entre a sonda isolada e a incubada com extracto proteico, podendo-se inferir sobre a ocorrência de interações do tipo RNA-proteína. A maioria dos protocolos descritos na literatura utiliza sondas radioactivas pelo que após transferência do gel para uma membrana a detecção é feita através de uma

autoradiografia. Dado que no presente estudo pretendemos efectuar a detecção de sondas biotiniladas, foi necessário estabelecer um procedimento adequado, pelo que se combinou o ensaio de gel de retardação com técnicas de *blotting*.

O sistema não radioactivo de detecção de RNA estabelecido foi um sistema no qual a biotina, incorporada nas sondas durante a transcrição *in vitro*, é reconhecida por avidina ligada ao enzima peroxidase de rábano (avidina-HRP), que por sua vez, possibilita a formação de sinal quimioluminiscente e, portanto, a detecção do RNA.

Para testar primeiramente o sistema de detecção realizou-se um ensaio de *dot-blot*. Num primeiro ensaio, para garantir a especificidade dos sinais obtidos aplicou-se em membranas de PVDF uma série de diluições 1:2 de gotas de sonda biotinilada e não biotinilada. Como se observa na **Figura 15A**, apenas é observado sinal nas zonas onde foi aplicada sonda biotinilada, inferindo-se que o sinal obtido corresponde à detecção da biotina incorporada na sonda de RNA. Num ensaio análogo, aplicaram-se gotas de sonda isolada ou previamente incubada com extracto proteico em membranas de PVDF e nitrocelulose. Em ambos os casos foram utilizadas diferentes diluições de avidina ligada a peroxidase de rábano, dado que no ensaio anterior apesar de ser possível a observação do sinal, havia também muito ruído de fundo, que se tentou eliminar. Com as diluições crescentes de avidina-HRP observa-se um melhoramento da razão sinal/ruído, sobretudo da diluição de 1:50000, relativamente à de 1:100000 (**Figura 15B**). Na mesma figura, sugere-se, como já descrito na literatura, que a interacção do mRNA às membranas não terá grande afinidade, sendo este efeito mais notório nas membranas de nitrocelulose. Isto porque na zona de aplicação da sonda isolada, na membrana de nitrocelulose não houve detecção e na de PVDF, o sinal observado foi de fraca intensidade, quando comparados com os sinais correspondentes à de sonda incubada com extracto (**Figura 13B**). Isto poderá ser explicado pelo facto de ocorrer formação de mRNPs e as proteínas, ao adsorverem facilmente à superfície das membranas, facilitarem ao mesmo tempo a do mRNA e, portanto, a sua detecção.

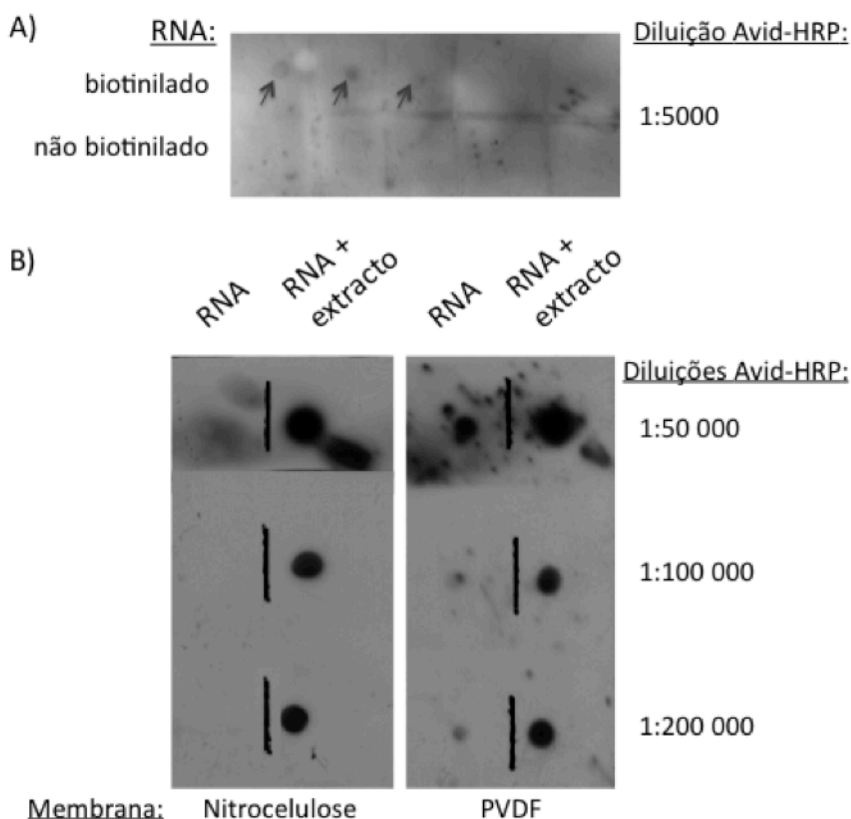


Figura 15 - *Dot blots* de **A)** sonda biotinilada e não biotinilada, numa série de diluições de 1:2, numa membrana de PVDF e utilizando uma diluição de avidina-HRP de 1:5000 e **B)** sonda isolada e previamente incubada com extracto proteico, detectadas com diferentes diluições de avidina-HRP, em membranas de nitrocelulose e de PVDF.

Considerando estes resultados concluiu-se que a transferência das amostras deveria ser sempre feita para membranas de PVDF, dado que, aparentemente, o RNA isolado não interage com a membrana de nitrocelulose. Adicionalmente, concluiu-se que para uma boa razão sinal/ruído deveriam ser utilizadas diluições de avidina-HRP elevadas e que este sistema de detecção não radioactivo, funcionando, podia ser utilizado na detecção do RNA após o *blot* para a membrana.

Tendo o método de detecção de RNA estabelecido, de modo a averiguar a formação de mRNPs nas condições utilizadas, após incubação da sonda B com extracto citosólico Be(2), correram-se as amostras num gel nativo de Acrilamida/Bis-Acrilamida e realizou-se a transferência para uma membrana de PVDF. Neste ensaio

foram analisadas as amostras de apenas extracto proteico, apenas sonda livre e de sonda incubada com extracto proteico.

Analisando a **Figura 16**, na pista onde foi corrido o extracto proteico apenas se observa a presença de um sinal dentro do poço onde a amostra foi aplicada. Por seu lado, na amostra apenas com sonda isolada observam-se duas bandas: uma mais intensa e com uma maior distância de migração, que corresponderá à sonda livre e uma segunda, mais pesada e

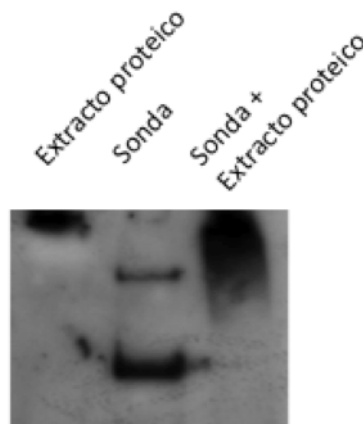


Figure 16 - Ensaio de gel de retardação de RNA. Análise das amostras de extracto proteico de células Be(2), sonda B específica isolada e sonda+extracto.

menos intensa, que poderá corresponder à formação de híbridos da sonda. Com a amostra de sonda+extracto, observa-se um banda de sinal intenso e aspecto espreado e com menor migração no gel relativamente às bandas observadas com a sonda isolada, pelo que, deverão corresponder aos complexos mRNPs (RNA+proteína). Dado que qualquer dos sinais da sonda isolada ou sonda+extracto não são detectados na amostra só com extracto, sugere-se que ambos os sinais (supostamente, RNA e mRNPs) não surgem de quaisquer efeitos inespecíficos e poder-se-á justificar o sinal detectado dentro do poço onde foi aplicado apenas extracto citosólico pela retenção de alguma proteína que liga a biotina ou a uma proteína reconhecida inespecificamente pela avidina. Assim, nas condições de incubação utilizadas, conclui-se que pela observação do “retardamento” na migração do mRNA na presença de extracto proteico, relativamente à sonda livre, ocorre formação de complexos mRNP e, portanto, que as condições de incubação utilizadas são adequadas.

4.2.3 Análise do padrão de proteína precipitada com as sondas biotiniladas

Tendo-se demonstrado a formação de complexos entre sonda biotinilada e

proteína, pretendeu-se seguidamente averiguar a existência de interações específicas de sequência, permitindo, posteriormente a identificação de proteínas que interagem com o 3'UTR do mRNA do *SMN2*. Para isso, após incubação de cada sonda (específica e respectivo controlo negativo) com os extractos proteicos de HEK-293 (fibroblastos de rim humanos) e Be(2) (linha celular de neuroblastoma) adicionaram-se *beads* de agarose ligadas a Streptavidina, a qual interagindo com a biotina incorporada nas sondas, possibilitou o seu *pull-down*, bem como o das proteínas que interagiam com as sondas. As amostras de proteína precipitada foram resolvidas por SDS-PAGE e, para a visualização das bandas, os géis foram corados com nitrato de prata. Na análise dos resultados, todas as bandas de proteína presentes nas amostras com sonda específica e que não estavam presentes nas amostras controlo ou que representassem um enriquecimento relativamente a este último foram consideradas como potenciais proteínas de ligação ao 3'UTR do *SMN2*

Nos géis obtidos observaram-se bandas específicas (**Figura 17 e 18**, assinaladas com uma seta). No entanto, analisando a quantidade de proteína nas amostras controlo, nota-se que o ruído trazido no precipitado é muito elevado. Este poderá ser explicado, por exemplo, pela precipitação de proteínas que interagem com as *beads*. Foi feita uma tentativa de diminuir este ruído por incubação prévia das *beads* com BSA (adicionalmente ao tRNA) e/ou com lavagens do precipitados mais agressivas (2 lavagens com um tampão com 0.3% NP-40, seguidas de outra com um tampão com 0.3% NP-40+0.5% SDS, em vez de 2 lavagens sem detergente e 1 lavagem com um tampão com 0.3% NP-40). Dos resultados obtidos, observou-se que a banda de BSA tinha grande intensidade e interferia com a identificação de proteínas específicas na gama dos 70 kDa (pista 1, **Figura 17**), enquanto as lavagens muito agressivas eliminavam não só o ruído, como também os sinais específicos (pista 4 e 6, **Figura 17**). Uma abordagem alternativa seria a indução da ligação covalente entre os complexos mRNPs, isto é, após incubação entre sonda e extracto poder-se-ia irradiar o incubado com luz UV (400 mJ/cm², como anteriormente no

procedimento da hnRNP K) e proceder a lavagens mais agressivas que eliminassem o ruído. No entanto, este ensaio, devido à formação de ligações covalentes entre proteína e mRNA, faria com que a primeira adquirisse estruturas conformacionais que impediriam a sua boa digestão enzimática o que resultava na inviabilidade da identificação por espectrometria de massa.

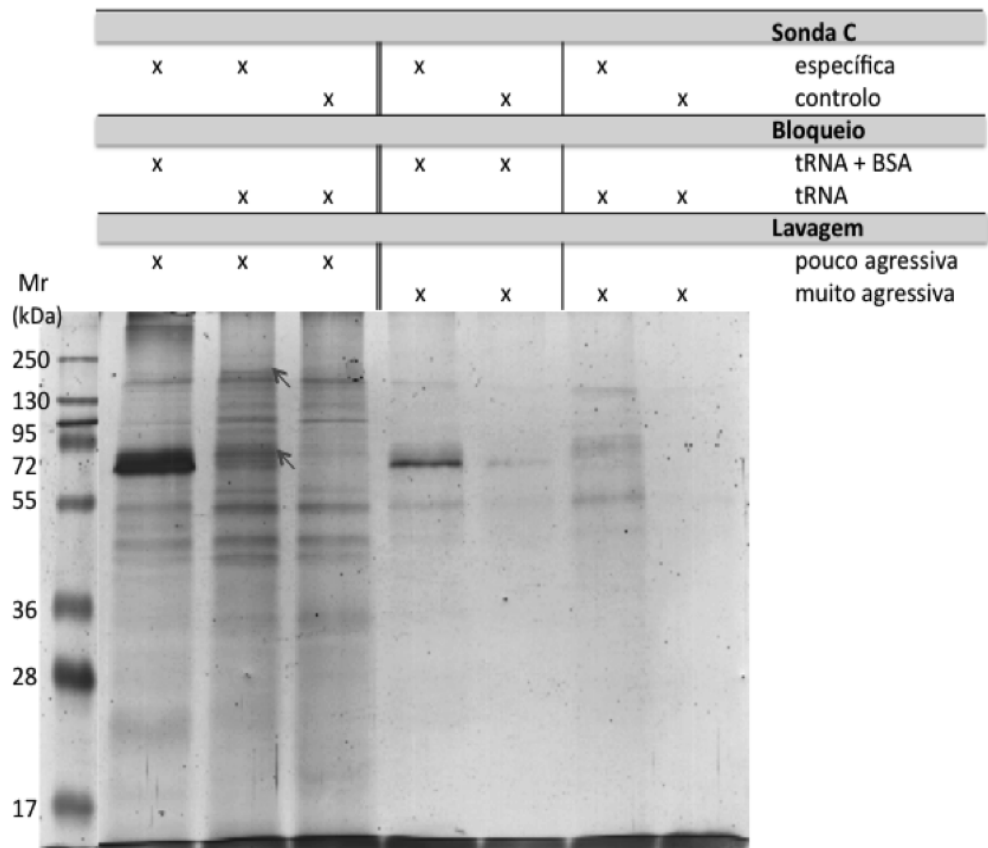


Figura 17 – Pull-down da sonda C após incubação com extracto de HEK-293, com diferentes tipos de bloqueio (só com tRNA ou com tRNA+BSA) e lavagens (pouco ou muito agressivas).

Apesar do ruído observado, em todas as condições, exceptuando com a incubação entre a sonda A e o extracto Be(2), observaram-se bandas específicas (**Figura 18**), demonstrando a existência de potenciais proteínas reguladoras do transcrito do *SMN2*. Estas foram, portanto, alvo de tratamento para espectrometria

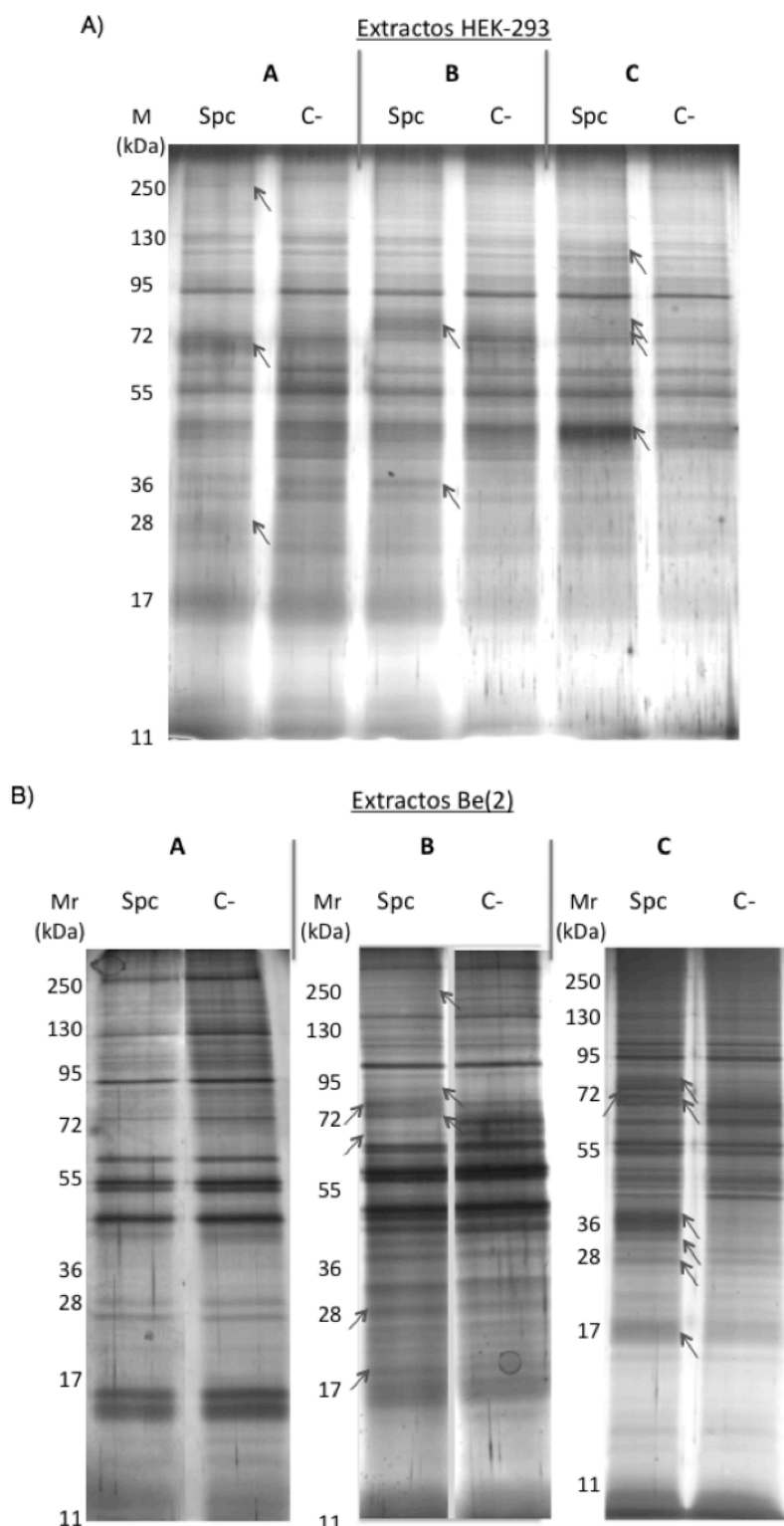


Figura 18 – Pull-down das sondas A, B e C específicas (Spc: A1, B1 e C1) e controlo (C- : A2, B2, C2) após incubação com os extractos **A)** HEK-293 ou **B)** Be(2). As setas indicam as bandas correspondentes a proteínas que se ligam especificamente ao segmento do 3'UTR.

de massa para respectiva identificação. De assinalar que entre sondas se observam bandas específicas diferentes, evidenciando o papel das diferentes sequências em cada fragmento no perfil de interacção. Adicionalmente, embora se observem aparentemente as mesmas bandas também se observam perfis diferentes da mesma sonda com diferentes extractos, o que poderá ser explicado pela expressão génica diferencial de cada tipo de linha celular. Note-se que ambos os tipos de celulares, embora diferentes, são comumente utilizados como modelos de células neuronais. As células Be(2) são uma linha celular de neuroblastoma, isto é, células neuronais transformadas e as células HEK-293, embora sejam fibroblastos embrionários de rim partilham muitas características com células neuronais imaturas.

4.2.4 Identificação de proteínas de ligação aos fragmentos do 3'UTR por espectrometria de massa

Tendo-se verificado a existência de proteínas que estabelecem uma interacção específica de sequência com segmentos do 3'UTR do mRNA do gene *SMN2*, procedeu-se igualmente à sua identificação por espectrometria de massa. Assim, após selecção, excisão das proteínas do gel, digestão enzimática das mesmas com tripsina e análise por MALDI-TOF, procedeu-se à sua identificação por *Peptide Mass Fingerprinting*. A tripsina é um protease de serinas, pelo que aquando da sua incubação com as bandas de proteína, ocorre a hidrólise das proteínas nesses resíduos, gerando vários fragmentos peptídicos cuja razão massa/carga é determinada pelo espectrómetro. Um espectro de massa assim obtido fornece um padrão muito específico da proteína original, pelo que se torna possível fazer a identificação por comparação dos resultados obtidos com uma base de dados do “*fingerprint*” das proteínas. A ferramenta utilizada foi o *MASCOT Peptide Mass Fingerprinting* (www.matrixscience.com).

Foi efectuado um ensaio preliminar com bandas retiradas de uma amostra. No entanto, não foi obtido qualquer sinal que permitisse fazer a identificação. Optou-se

então por fazer o processo em quaduplicado, de modo a aumentar a quantidade de péptidos gerados, que permitiu a obtenção de espectros e a identificação da proteína original (**Tabela 4**). De acordo com as indicações do *software* utilizado, considera-se que um *score* acima do valor igual a 53 corresponde a uma identificação com confiança.

Tabela 4 – Identificação e respectivo *score* obtido por *Peptide Mass Fingerprinting* das proteínas seleccionadas como específicas. A identificação foi feita apenas para proteínas específicas resultantes da do *pull-down* da sonda C, após incubação com extracto HEK-293 e Be(2), e da sonda B, com extracto Be(2).

Sonda	Extracto celular	Proteína identificada	Score
C	HEK-293	Nucleotide-binding protein- like	136
		Histona H1	107
		LARP1	72
C	Be(2)	tubulina	137
		LARP2	104
		hnRNP G	58
B	Be(2)	LARP4	132
		Nexina	78

Outra limitação técnica na identificação das proteínas por espectrometria de massa de um gel 1D diz respeito à purificação de cada banda, isto porque o elevado ruído no *pull-down* pode ter gerado cortes de bandas com mais do que uma proteína que, nalguns casos, pode ter impossibilitado a identificação.

Nos precipitados da sonda C com extractos HEK-293 identificaram-se como bandas específicas as proteínas Ras-like GTPase e LARP1. A proteína Ras-like GTPase, ou *Nucleotide-binding protein-like*, é codificada pelo gene *NUBPL*, e é ainda uma proteína pouco estudada. Relativamente à sua função na célula, apenas se encontra sugerida a sua função como factor auxiliar na associação do complexo I na cadeia respiratória na membrana mitocondrial provavelmente através da sua capacidade de ligação de centros de Ferro/Enxofre (Fe/S) e entrega ao complexo⁴⁹. Apesar desta

função não estar relacionada com o metabolismo de mRNAs, observou-se que a banda correspondente a esta proteína apareceu de forma específica e recorrente nos *pull-downs* efectuados, para além disto, bioinformaticamente é prevista a função de ligação a nucleótidos, pelo que poderá ser um candidato à ligação ao UTR do *SMN2*. A LARP1 é uma proteína da família das LARPs (*La-related proteins*), com capacidade de ligar a mRNA e de modular, pela negativa, a sua estabilidade⁵⁰.

As proteínas de extracto Be(2) precipitadas com a sonda C identificadas foram a β -tubulina, LARP2 e hnRNP G. A β -tubulina é uma proteína expressa constitutivamente e que constitui os filamentos do citoesqueleto⁵¹. Dado que a sua estrutura e função não se relaciona com regulação pós-transcricional, a sua detecção poderá ser justificada por existir em grande quantidade. Mais uma vez foi detectada uma proteína da família das LARPs, a LARP2. Esta proteína é também designada por LARP1b, uma vez que partilha elevada identidade com a LARP1 e também se prevê que tenha funções no metabolismo de mRNAs⁵⁰. A hnRNP G pertence a uma conhecida família de *RNA-binding proteins*, com diversas funções no metabolismo de mRNAs⁹ e, para além disso, foi também uma das proteínas que se previu bioinformaticamente (usando a ferramenta *Splicing Rainbow*) ligar-se ao 3'UTR do gene *SMN2*, nomeadamente à sonda C (**Tabela 5**), o que seria um bom indicativo como potencial ligando do UTR e regulador do transcrito.

Tabela 5 - Esquematização dos resultados obtidos na previsão bioinformática, utilizando a ferramenta *Splicing Rainbow*, do número de locais de ligação da proteína hnRNP G ao segmento C do 3'UTR do *SMN2*, bem como a medida do número de locais de ligação em função do tamanho do segmento (Nr./100 nt).

RNA-binding protein	3'UTR do <i>SMN2</i> segmento C		
	Nr. Locais de ligação	Motivo de reconhecimento: poli-A	Nr./100 nt
hnRNP G	6	7-8 A's (em 10)	2.3

Da identificação das bandas resultantes do *pull-down* da sonda C com proteínas do extracto citosólico de células Be(2) resultaram a LARP4 e uma proteína da família

das nexinas. As nexinas são proteínas envolvidas no *sorting*⁵², sem qualquer envolvimento na regulação de mRNAs pelo que não será considerada como potencial proteína de ligação ao 3'UTR do *SMN2*. A LARP4 é outro elemento da família LARP, com localização maioritária no citoplasma, associa-se a polirribossomas e interage com a Poli-A *binding protein* (PABP). Ao contrário, da LARP1, dados da literatura reportam que, pela interacção com mRNAs, poderá ter um efeito positivo na sua estabilidade⁵⁰.

De modo confirmar que qualquer uma das proteínas identificadas se liga ao 3'UTR do *SMN2* seria essencial um ensaio de confirmação. Com esse objectivo, por exemplo, poderá ser feito um *pull-down* da sonda específica e controlo e uma análise das duas amostras por *Western blot*, utilizando um anticorpo contra a proteína de interesse. Se a proteína em estudo interagir de facto com o 3'UTR, dever-se-á detectar um sinal quimioluminescente no ensaio específico e nenhum sinal no ensaio controlo.

5. DISCUSSÃO

5.1 Interação da hnRNP K com os transcrito ASF/SF2 e SRp20 em resposta a estimulação bacteriana

Este estudo inseriu-se numa colaboração com a Unidade de Biologia Celular do Sistema Imune do Instituto de Medicina Molecular, com o objectivo de esclarecer alguns mecanismos moleculares subjacentes à regulação da secreção de IL-1 β pelas RBPs ASF/SF2, SRp20 e hnRNP K. Com base nas observações efectuadas pelo grupo e os dados existentes na literatura, foi proposto o modelo (**Figura 19**) segundo o qual, os PRRs de células monocíticas, ao reconhecerem os PAMPs à superfície das bactérias, sinalizam para a activação da via MAPK/ERK¹⁸ a qual, por sua vez, conduz à fosforilação de resíduos de serina da hnRNP K, ao nível do núcleo (onde se encontra maioritariamente), promovendo a sua translocação e acumulação no citosol^{2,53}. Aqui, ao interagir com o 3' UTR dos transcritos (nomeadamente os que codificam o ASF/SF2 e o SRp20), a proteína hnRNP K modularia a sua expressão². Tendo em consideração que tanto o ASF/SF2 como o SRp20 apresentam diminuição tanto dos níveis de transcrito como de proteína, sugere-se que esta modulação da sua expressão ocorra ao nível da estabilidade do mRNA, não se podendo excluir um efeito na tradução.

Ao promover o contacto das células THP-1 com as bactérias *E. coli* observou-se uma clara interacção entre os transcritos do ASF/SF2 e SRp20 e a hnRNP K (**Figura 8**), o que valida o modelo sugerido.

Quando se pretendeu testar o efeito da via MAPK/ERK na interacção da proteína hnRNP K com os transcritos, relativamente ao do SRp20, corroborou-se que em resposta a um estímulo com *E. coli* ocorre a formação de complexos mRNP com a hnRNP K (**Figura 9**), bem como o decréscimo dos níveis totais do transcrito (**Figura**

10). Na presença de inibidor, estes dois efeitos foram abolidos, pelo que se consideram que são dependentes da activação da via MAPK/ERK (**Figura 11**).

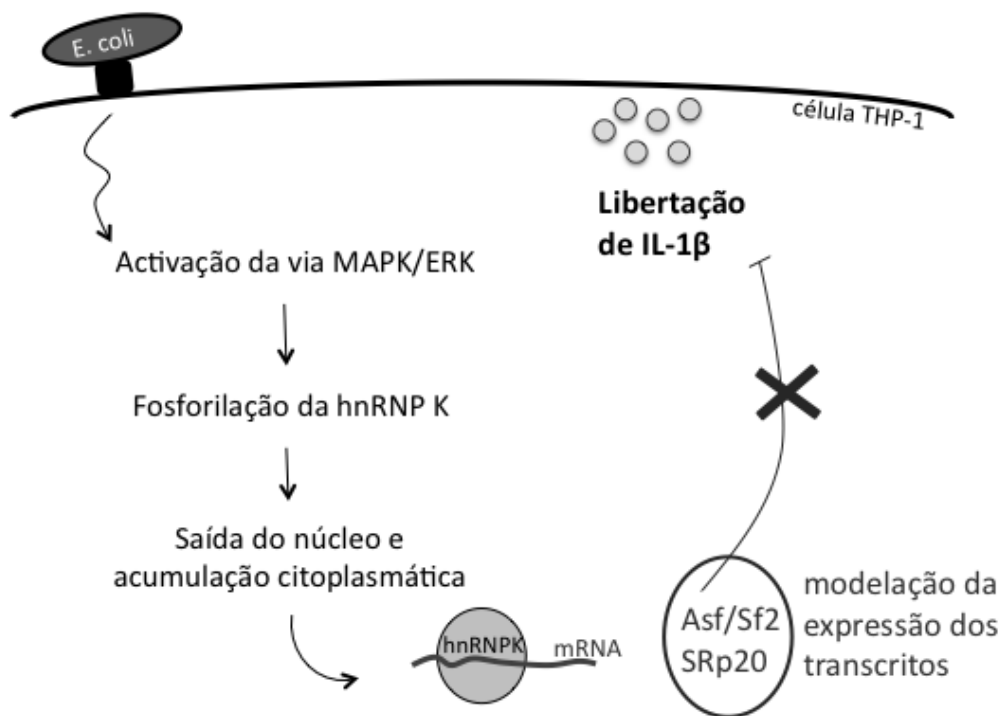


Figure 19 - Representação esquemática do modelo sugerido para a regulação da secreção da citocina IL-1 β . As bactérias sinalizam para a activação da via MAPK/ERK ao serem reconhecidas pelos PRRs, levando à fosforilação da hnRNP K e translocação desta para o citoplasma, onde interagindo e modelando a expressão dos transcritos SRp20 e ASF/SF2, influência negativamente a secreção da citocina.

Relativamente ao transcrito que codifica o ASF/SF2 não foi possível retirar qualquer conclusão, isto porque os resultados não foram concordantes com o primeiro ensaio de averiguação de interacção efectuado, nem com os resultados previamente obtidos pela UBCSI. Isto é, no estudo do controlo da associação da hnRNP K com o transcrito do ASF/SF2, na ausência de inibidor, não voltou a ser observada interacção em consequência do estímulo bacteriano (**Figuras 8 e 9**). Adicionalmente, quando analisados os níveis totais do mesmo mRNA, verificou-se

um aumento aquando da estimulação (**Figura 10**), em vez de uma diminuição, como anteriormente observado. Estas grandes flutuações nos resultados relativos ao transcrito do ASF/SF2 foram também obtidos pela UBCSI em células THP-1 que, no entanto, mostrou um comportamento consistente sempre que foram utilizados monócitos de sangue periférico para ensaios semelhantes.

Para completar as informações sobre o modelo proposto, utilizando células THP-1, realizou-se um ensaio de imunofluorescência, no qual se utilizou um anti-corpo anti-hnRNP K e se corou o núcleo de azul com DAPI. Este ensaio permitiu observar a localização subcelular da proteína consoante o tratamento dado às células. Os resultados obtidos (não mostrados) sugerem, sobretudo às 4 horas de estimulação com *E. coli*, que ocorre translocação da hnRNP K para o citosol. No entanto, nas células em que foi observada a acumulação citosólica, também se observava uma condensação gradual da cromatina com o aparecimento de um padrão de marcação periférico característico de um perfil apoptótico, sugerindo que as células THP-1 estariam a entrar em apoptose. Estas observações sugerem então que o modelo celular usado poderá não ser o mais apropriado, podendo o facto das células começarem a entrar em apoptose explicar a grande variabilidade de resultados para o ASF/SF2. Por outro lado, a linha celular THP-1 demonstrou ser bastante sensível ao número de passagens, podendo justificar as discrepâncias dos últimos resultados obtidos. Como já referido, a UBCSI obteve resultados bastante consistentes utilizando monócitos do sangue periférico. Este, porém, não é um modelo celular compatível com o nosso tipo de estudo, o qual exige uma grande quantidade de células que não é fácil de obter directamente a partir de fontes primárias.

De futuro, para uma validação mais completa do modelo seria interessante analisar os níveis de fosforilação da hnRNP K utilizando anticorpos anti-fosfoserina, uma vez que são estes os resíduos descritos como sendo fosforilados pela via MAPK/ERK e promovendo a translocação da proteína para o citosol. Assim, com a

estimulação bacteriana esperar-se-ia observar um aumento dos níveis deste resíduo fosforilado e, na presença do inibidor da via MAPK/ERK, a estimulação não deveria causar quaisquer alterações.

Com este trabalho concluiu-se que em células THP-1, em resposta a estimulação bacteriana, ocorre interacção entre o transcrito SRp20 e a hnRNP K e que esta é dependente da activação da via MAPK/ERK. Paralelamente, observou-se um decréscimo dos níveis totais do transcrito, o qual também deixou de ser observado na presença de inibidor. Estes dados, em conjunto, podem sugerir que a regulação da expressão deste transcrito ocorre ao nível da modelação da estabilidade, sendo mediada pela hnRNP K. Apesar dos resultados inconclusivos relativamente à influência da via MAPK/ERK, concluiu-se ainda que em consequência do contacto de células THP-1 com *E. coli* também ocorre interacção entre hnRNP K e o transcrito do ASF/SF2.

A IL-1 β é uma citocina importantíssima na sinalização de respostas inflamatórias¹⁹. No entanto, a sua libertação em excesso tem sido associada ao aparecimento de doenças inflamatórias, sendo que as terapias que têm vindo a ser maioritariamente usadas se baseiam no bloqueio da citocina¹⁹. Muito pouco tem sido estudado sobre a regulação da secreção da IL-1 β pelo que este estudo, nomeadamente sobre os mecanismos envolvidos na estabilidade de efectores negativos da libertação da citocina, poderá ser usado em benefício do desenvolvimento de novas terapias com base na modelação da expressão génica.

5.2 Identificação de potenciais proteínas de ligação ao 3'UTR do *SMN2*

Na célula, a regulação da estabilidade dos mRNAs ocorre sobretudo ao nível do citosol e por intermédio da ligação de proteínas, as RBPs, ao 3'UTR dos transcritos, promovendo uma aumento ou diminuição da sua estabilidade. Como tal, teve-se como objectivo a identificação de proteínas que se ligassem especificamente ao

3'UTR do *SMN2*. O estudo foi feito em 3 segmentos do 3'UTR, o que permitiu uma identificação mais específica de região.

A realização de um gel de retardação, e a observação de uma menor migração do sinal correspondente à amostra de RNA+proteína relativamente à da sonda isolada de RNA (**Figura 16**), permitiu primeiro a confirmação de que as condições de incubação entre sonda e extracto proteico eram adequadas, conduzindo à formação de complexos mRNP. Visto isto, pretendeu-se, em seguida, isolar os complexos formados e identificar as proteínas que, por visualização em gel, potencialmente se ligam especificamente ao 3'UTR do *SMN2*. Nos resultados apresentados nas **Figuras 17 e 18** observam-se várias proteínas específicas (apenas presentes na amostra específica ou enriquecidas relativamente ao controlo) com excepção da amostra resultante da incubação do extracto de Be(2) com a Sonda A1. Nota-se, no entanto, um elevado ruído (devido à eventual precipitação de proteínas que interagem com as *beads*, por exemplo) que muito embora tenham sido aplicados, nos ensaios de *pull-down*, diferentes bloqueios e/ou lavagens do precipitado, não foi eliminado sem a perda do sinal específico (**Figura 17**).

As proteínas seleccionadas como específicas foram recolhidas para identificação por espectrometria de massa. A técnica utilizada para identificação foi *Peptide Mass Fingerprinting* e os péptidos gerados por digestão enzimática foram analisados por MALDI-TOF. Apesar das limitações de quantidade e purificação das amostras, foi conseguida a identificação de várias bandas como potenciais ligandos do 3'UTR do *SMN2*, nomeadamente: as proteínas NUBPL, LARP1, LARP2, LARP4 e hnRNP G. Com excepção da NUBPL, todas estas proteínas estão descritas na literatura como estando envolvidas em processos de regulação do metabolismo dos mRNAs, pelo que constituem bons candidatos como modeladores do *SMN2*.

A NUBPL é uma proteína ainda muito pouco estudada, tendo-se reportado apenas a sua função como auxiliar na associação do complexo I da cadeia respiratória⁴⁹, a qual ocorre ao nível da membrana interna mitocondrial. Neste

estudo foi reportada a capacidade da proteína se ligar a centros de Fe/S⁴⁹. No entanto, pela análise dos domínios da proteína, também se prevê a ligação a nucleótidos. Visto isto, e dado que a banda correspondente a esta proteína estava, recorrentemente, presente nas amostra de *pull-down* específico, é possível que também possa estar envolvida em processos de regulação pós-transcricional, nomeadamente na do transcrito do *SMN2*.

A família das proteínas La já foi largamente estudada a nível estrutural e funcional⁵⁰. Apresentam um motivo La (LAM) e um RRM os quais, em conjunto, actuam sobre mecanismos de síntese de tRNAs. Outra função conhecida das proteínas La é a modulação da tradução de determinados mRNAs⁵⁰. As *La-related proteins* (LARPs) são proteínas que se pensa terem evoluído de forma diferente das proteínas La mas que mantiveram o motivo característico LAM. Dada a elevada conservação entre as proteínas La e LARPs dos resíduos de aminoácido envolvidos no reconhecimento de RNA é esperado que o modo de ligação destas proteínas seja semelhante e, portanto, apresentem também funções relacionadas com o metabolismo de mRNAs⁵⁰. Relativamente à LARP1, pensa-se que esteja envolvida na degradação de mRNAs (sugeriu-se que em *C. elegans* a LARP1 destabiliza os transcritos da via Ras-MAPK⁵⁴) e, inclusivamente, foi observado o seu enriquecimento em *P-bodies*⁵⁴ (locais associados a degradação de mRNAs). Sobre a LARP2 pouco se encontra descrito na literatura, apenas que também é designada por LARP1b devido à elevada percentagem de identidade (59%)⁵⁰, o que poderá sugerir também semelhança de função. Foi observado que o domínio de reconhecimento de RNA da LARP4, partilhado entre as outras LARPs, diverge em alguns resíduos de aminoácido, evidenciando que possa ter diferentes funções e/ou mRNAs alvo. Adicionalmente, foi descrito que a proteína se encontra maioritariamente no citoplasma, se associa a polirribossomas e que interage com a poli-A *binding-protein* (PABP)⁵⁰. Esta interacção poderá justificar a relação entre a actividade da LARP4 e a estabilização de mRNAs⁵⁰. Note-se que a PABP ao interagir com a cadeia poli-A de

um mRNA promove interacções 5'-3' que conduzem à formação de um *loop* fechado⁵⁵, o qual induz uma maior eficiência de tradução⁵⁶. Apesar de poder não ser o passo limitante da degradação de um mRNA, a sua circularização poderá, ao simultaneamente, promover um aumento da estabilidade.

A hnRNP G pertence à família das hnRNPs, as quais estão largamente descritas como reguladoras de eventos pós-transcricionais. Esta proteína apresenta dois domínios de ligação a mRNA, o RBD e RGG, e participa em mecanismos de *splicing*⁹. Apesar de, ao que sabemos, nunca ter sido observado o seu papel em fenómenos de estabilização de mRNAs, o seu envolvimento na do *SMN2* não deve ser posto de parte, isto porque é conhecida a multiplicidade de funções que uma única hnRNP pode desempenhar. Adicionalmente, a identificação desta proteína como potencial ligando do 3'UTR do *SMN2* é apoiada pela previsão bioinformática utilizando a ferramenta *Splicing Rainbow*, da ligação desta proteína à sonda C, com que foi detectada (**Tabela 5**).

No futuro, para confirmar se ocorre de facto ligação específica ao 3'UTR do *SMN2* de cada uma das proteínas, deve ser feito um ensaio de confirmação, por exemplo, através da análise das amostras obtidas por *pull-down* da sonda específica e controlo por *Western blot*, utilizando um anticorpo contra a proteína de interesse. A deteacção de sinal apenas no ensaio específico determina que o resultado seja positivo. Também como forma de validação dos resultados poderia ser utilizada uma abordagem semelhante à utilizada no estudo das interacções da hnRNP K. Isto é, identificando uma proteína candidata à ligação ao transcrito do *SMN2* poder-se-ia proceder à sua imunoprecipitação no extracto adequado e por PCR quantitativo determinar se ocorre interacção com o transcrito do *SMN2* (**Figura 6**, passos 2 a 4).

Dentro do contexto do estudo da doença SMA, o conhecimento dos intervenientes envolvidos na estabilidade do transcrito do *SMN2* é importante na medida em que, identificando por estudos funcionais os elementos que promovem uma destabilização do transcrito, poderá ser fornecido o conhecimento para o

desenvolvimento de terapias com base na modelação da sua estabilidade e com o objectivo último de aumentar a produção de proteína SMN funcional. Têm sido, por exemplo, desenvolvidas terapias usando *morpholinos*, que impedem a ligação de factores *trans* às sequências de mRNAs^{40,41,42}. A SMA seria uma potencial candidata à utilização deste tipo de terapia, sendo que os *morpholinos* poderiam ser utilizados para impedir a ligação de RBPs destabilizadoras do transcrito do *SMN2* ao seu 3'UTR.

5.3 Notas finais

Actualmente, a par da crescente consciencialização da importância dos mecanismos pós-transcricionais na regulação da expressão génica, tem vindo a aumentar a necessidade de ferramentas que possibilitem a sua caracterização. No presente estudo, foram utilizadas algumas destas ferramentas em duas abordagens diferentes mas que, por isso, se podem complementar. Nestas, pretendeu-se identificar: 1) por um lado, mRNAs alvo de uma RBP em particular, a hnRNP K e 2) por outro, proteínas que se ligassem ao 3'UTR de um mRNA específico, o do *SMN2*. Embora algumas das técnicas tenham sido já descritas na literatura, enquanto abordagens correntes de laboratório, ainda se encontram pouco estabelecidas, talvez por serem de difícil optimização, como é o caso do gel de retardação de RNA não radioactivo. Assim, a optimização de algumas das técnicas utilizadas, para além do valor de aprendizagem pessoal, estando estabelecidas, têm ainda a importância de poderem ser utilizadas noutros contextos semelhantes estudados no laboratório de acolhimento.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Sanchez-Diaz, P. (2006), **Post-Transcription Meets Post-Genomic, RNA Biology The Saga of RNA Binding Proteins in a New Era**, *RNA Biology*, 3(3), 101-09
- [2] Mata, J. *et al.* (2005), **Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective**, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 30(9), 506-14
- [3] Siomi, H. *et al.* (1997), **RNA-binding proteins as regulators of gene expression**, *Current Opinion in Genetics Development*, 7, 345-53
- [4] Mignone, F. *et al.* (2002), **Untranslated regions of mRNAs**, *Genome Biology*, 3(3), 2-10
- [5] Dreyfuss, G. *et al.* (2002), **Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry**, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 195-205
- [6] Moore, M. (2005), **From birth to Death: The Complex Lives of Eucaryotic mRNAs**, *Science*, 309, 1514-18
- [7] Huang, Y. *et al.* (2004), **SRprises along a Messenger's Journey**, *Molecular Cell*, 17, 613-5
- [8] Shepard, P.J. *et al.* (2009), **The SR protein family**, *Genome Biology*, 10, 242 1-9
- [9] Kercic, A.M. *et al.* (1999), **hnRNP complexes: composition, structure and function**, *Cell Biology*, 11, 363-71
- [10] Ule, J. *et al.* (2003), **CLIP Identifies Nova-Regulated RNA Networks in the Brain**, *Science*, 302, 1212-15
- [11] Grzybowska, E.A. *et al.* (2001), **Regulatory functions of 3'UTR**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, 291-295
- [12] Zhang, T. *et al.* (2002), **AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors**, *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 952-8
- [13] Barreau, C. *et al.* (2005), **AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?**, *Nucleic Acids Research*, 33(22), 7138-50
- [14] Bolognani, F. *et al.* (2008), **RNA-Protein Interactions and Control of mRNA Stability in Neurons**, *Journal of Neuroscience Research*, 86, 481-9
- [15] Ross, J., *et al.* (1985), **Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes**, *Blood*, 66(5), 1149-54
- [16] Lynch, K. W. (2004), **Consequences of Regulated pre-mRNA Splicing in the Immune System**, *Nature Reviews Immunology*, 4, 931-40
- [17] Medzhitov, R., Janeway, C. A. (1997), **Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition**, *Cell*, 91, 295-8
- [18] Libby, M. (2007), **Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease**, *Nutrition Reviews*, 65(12), S140-6
- [19] Dinarello, A. (2009), **Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 family**, *The Annual Review of Immunology*, 27, 519-50
- [20] Abdul-Sater, A. A. (2009), **Inflammasome bridge signaling between pathogen identification and the immune response**, *Drugs of Today*, 45, 105-12

- [21]Leeman, J.R. *et al.* (2008), **Alternative Splicing in the NF- κ B Signaling Pathway**, *Gene*, 423, 97-107
- [22]Khabar, K.S.A. (2007), **Rapid transit in immune cells: the role of mRNA turnover regulation**, *Journal of Leukocyte of Biology*, 81, 1335-44
- [23] Lukong, K.E. *et al.* (2008), **RNA-binding proteins in human genetic diseases**, *TRENDS in Genetics*, 24(8), 416-25
- [24]Czeizel, A., Hamula, J. (1989), **A Hungarian study on Werdnig-Hoffman disease**, *Journal of Medical Genetics*, 26, 761-3
- [25]Wirth, B. (2006), **Spinal Muscular Atrophy: From Gene to Therapy**, *Seminar in pediatric neurology*, 13(2), 121-31
- [26]Lefebvre, S. *et al.* (1995), **Identification and characterization of a Spinal Muscular Atrophy-determining gene**, *Cell*, 80, 155-65
- [27]Kolb, S. *et al.* (2007), **Molecular Functions of the SMN Complex**, *Journal of Child Neurobiology*, 22(8), 990-4
- [28]Lorson, C.L. *et al.* (1999), **A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 6307-11
- [29] Vitte, J. *et al.* (2007), **Refined Characterization of the Expression and Stability of the SMN Gene Products**, *The American Journal of Pathology*, 171(4), 1269-80
- [30]Wirth (2000), **An update of the Mutation Spectrum of the Survival Motor Neuron Gene (SMN1) in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA)**, *Human Mutation*, 15, 228-37
- [31]Wirth, B. *et al.* (1999), **Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling**, *American Journal of Human Genetics*, 64, 1340-56
- [32]Cobben, J.M. *et al.* (2008), **Survival in SMA type I: A prospective analysis of 34 consecutive cases**, *Neuromuscular Disorders*, 18, 541-44
- [33]Feldkötter, M. (2002), **Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time LyghtCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy**, *American Journal of Human Genetics*, 70, 352-68
- [34]Wirth, B. *et al.* (2006), **Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number**, *Human Genetics*, 119, 422-8
- [35]Monani, U.R. (2000), **The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*^(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy**, *Human Molecular Genetics*, 9(3), 333-9
- [36]Gubitz, A.K. *et al.* (2004), **The SMN complex**, *Experimental Cell Research*, 296, 51-56
- [37]Rossoll, W. *et al.* (2003), **Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons**, *The Journal of cell biology*, 163(4), 801-13
- [38]Cho, S. *et al.* (2010), **A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity**, *Genes and Development*, 24, 438-42

- [39]Burnett, B.G. *et al.* (2009) **Regulation of SMN Protein Stability**, *Molecular and Cellular Biology*, 29(5), 1107-15
- [40]Choi W.Y., *et al.* (2007), **Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430**, *Science*, 318, 271-4
- [41]Alter J., *et al.* (2006), **Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology**, *Nature Medicine*, 12, 175-7
- [42]Li Y-F., *et al.* (2008), **Design and Synthesis of Dendritic Molecular Transporter that Achieves Efficient in Vivo Delivery of Morpholino Antisense Oligo**, *Bioconjugate Chemistry*, 19,1464-70
- [43]Alves, P.M., *et al.* (2010), **shRNA-based Systematic Dissection of the Role of Splicing Factors in NF- κ B Activation Identifies SFRS3 as a Negative Regulator of IL-1 β Secretion** (em processo de escrita)
- [44]Habelhah, H., *et al.* (2001), **ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP K and inhibition of mRNA translation**, *Nature Cell Biology*, 3, 325-30
- [45]Siomi, H., *et al.* (1993), **The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif**, *Nucleic Acids Research*, 21(5), 1193-8
- [46]Thisted, T., *et al.* (2001), **Optimized RNA Targets of Two Closely Related Triple KH Domain Proteins, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K and CP-2KL, Suggest Distinct Modes of RNA Recognition**, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17484-96
- [47]Skalweit, A., *et al.* (2003), **Posttranscriptional Control of Renin Synthesis: Identification of Proteins Interacting With Renin mRNA 3'-Untranslated Region**, *Circulation Research*, 92,419-27
- [48]Evans J.R., *et al.* (1993), **Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo**, *Oncogene*, 22(39), 8012-20
- [49]Sheftel, A.D., *et al.* (2009), **Human Ind1, an Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor for Respiratory Complex I**, *Molecular and Cellular Biology*, 29(22), 6059-73
- [50]Bayfield, M.A., *et al.* (2010), **Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs)**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799(5-6), 365-78
- [51]Hammond, J., *et al.* (2008), **Tubulin modifications and their cellular functions**, *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1), 71-6
- [52]Bonifacino, J.S., *et al.* (2008), **Retromer**, *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4), 427-36
- [53]Choi, H.S., *et al.* (2009), **Poly(C)-binding Proteins as Transcriptional Regulators of Gene Expression**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(3): 431–436
- [54]Nykamp, K., *et al.* (2008), **C. elegans La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis**, *RNA*, 14(7), 1378-89
- [55]Wells, S.E., *et al.* (1998), **Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation factor**, *Molecular Cell*, 2, 135-40
- [56]Gallie, D.R. (1991), **The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency**, *Genes & Development*, 5, 2108-16

